

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



**INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA COMO DIANA
TERAPÉUTICA EN LA TRANSCRIPTASA INTERNA DEL
VIH-1 Y EN LA TRIPANOTIÓN REDUCTASA DE
*LEISHMANIA INFANTUM***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Pedro Alejandro Sánchez Murcia

Bajo la dirección de las doctoras

María José Camarasa
Sonsoles Velázquez

Madrid, 2013



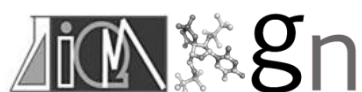
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I

Tesis Doctoral

**INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA COMO
DIANA TERAPÉUTICA EN LA TRANSCRIPTASA
INVERSA DEL VIH-1 Y EN LA TRIPANOTIÓN
REDUCTASA DE *LEISHMANIA INFANTUM***

Pedro Alejandro Sánchez Murcia

Instituto de Química Médica (CSIC)
Madrid, 2013



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación *Nucleósidos y análogos como fuente de moléculas bioactivas* del Instituto de Química Médica (CSIC), bajo la dirección de la Prof. María José Camarasa y la Dra. Sonsoles Velázquez, y dentro del marco de los proyectos SAF 2006-12713-C02-01, SAF 2009-131914-CO2-01 y BIPEDD-CM S-BIO-0214-2006 y S2010/BMD-2457.

El autor agradece la financiación otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (hoy en día Ministerio de Economía y Competitividad) mediante la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI 2007), gracias a la que ha sido posible la realización de este trabajo así como una estancia predoctoral de 4 meses en el la Universidad de Aarhus (Dinamarca).

ÍNDICE

<i>Nota sobre nomenclatura</i>	<i>i</i>
<i>Nota sobre puntuación</i>	<i>i</i>
<i>L-aminoácidos y nomenclatura</i>	<i>iii</i>
<i>Abreviaturas empleadas</i>	<i>v</i>
<i>Abstract</i>	<i>vii</i>

INTRODUCCIÓN GENERAL: LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA COMO DIANA TERAPÉUTICA

Desarrollo de moduladores de IPPs	3
Algunas estrategias para el descubrimiento de moduladores de IPPs	4

OBJETIVOS GENERALES..... 9

CAPÍTULO 1: PÉPTIDOS CÍCLICOS COMO INHIBIDORES DE LA TI DEL VIH-1

1.1. Introducción	11
1.1.1. Estructura y genoma del VIH	12
1.1.2. Ciclo replicativo del VIH-1 y estrategias terapéuticas	13
1.1.3. La Transcriptasa Inversa como diana terapéutica.....	16
1.1.4. Inhibidores de la TI del VIH-1	18
1.2. Antecedentes	25
1.2.1. La interfaz de dimerización de la TI como diana terapéutica	25
1.2.2. El asa $\beta 7/\beta 8$ como <i>hot spot</i> en la dimerización de la TI del VIH-1	30

1.2.3. Desarrollo de péptidos minimalistas del asa $\beta 7/\beta 8$	31
1.3. Objetivos	37
1.4. Síntesis	41
1.4.1. Estrategia sintética general	41
1.4.2. Serie 1. Péptidos cíclicos con puentes hidrocarbonados (1.13-1.17)	44
1.4.2.1. <i>Síntesis de los precursores lineales (1.22-1.24)</i>	44
1.4.2.2. <i>Reacción de metátesis</i>	48
1.4.2.3. <i>Reacción de hidrogenación</i>	54
1.4.3. Serie 2. Péptidos cíclicos con puente de 1,2,3-triazol (1.18 y 1.19).	55
1.4.3.1. <i>Síntesis de los precursores lineales</i>	55
1.4.3.2. <i>Reacción de cicloadición 1,3-dipolar alquino-azida</i>	58
1.4.4. Serie 3. Péptidos cíclicos con puente amida (1.20 y 1.21)	65
1.5. Estudio conformacional en disolución mediante técnicas de RMN	69
1.5.1. Asignación estructural	70
1.5.2. Desplazamientos conformacionales.....	72
1.5.3. Coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$)	80
1.5.4. Efecto nuclear Overhauser (NOE)	83
1.5.5. Cálculo de estructura usando el programa CYANA.....	86
1.6. Evaluación biológica <i>in vitro</i> de los péptidos 1.13-1.21 como inhibidores del proceso de la dimerización del VIH-1	94
1.7. Bibliografía	95

CAPÍTULO 2: INHIBIDORES DE LA DIMERIZACIÓN DE LA TryR DE LEISHMANIA INFANTUM

2.1. Introducción	115
2.1.1. Ciclo vital de Leishmania.....	116
2.1.2. Tratamiento actual de la Leishmaniasis	117

2.1.3. El metabolismo redox como elemento clave en la supervivencia de Leishmania.....	119
2.1.4. Inhibidores de la TryR.....	122
2.2. Antecedentes	127
2.2.1. Predicción de <i>hot spots</i> de la interfaz de dimerización de la Li-TryR.....	127
2.2.2. La interfaz de dimerización de la TryR de <i>L. infantum</i> como potencial diana terapéutica	130
2.3. Objetivos	133
2.4. Serie 1. Péptidos conformacionalmente restringidos de 2.01	135
2.4.1. Diseño <i>in silico</i> de los péptidos grapados.....	138
2.4.2. Síntesis de los péptidos grapados 2.06-2.09	143
2.4.2.1. Síntesis asimétrica de los aminoácidos cuaternarios de partida	144
2.4.2.2. Elongación y reacción de metátesis	152
2.4.2.3. Síntesis en disolución de los péptidos grapados saturados	155
2.4.3. Estudio estructural en disolución	158
2.4.3.1. Dicroísmo circular	158
2.4.3.2. Estudios de RMN	164
2.5. Serie 2. Análogos lineales de 2.01 (2.30-2.35)	171
2.5.1. Diseño	171
2.5.2. Síntesis	172
2.5.2.1. Síntesis de los péptidos 2.30 y 2.31 a partir de la peptidil-resina 2.36	174
2.5.2.2. Síntesis de los péptidos 2.32-2.35 a partir de la peptidil-resina 2.37	175
2.6. Evaluación biológica	178
2.6.1. Inhibición de la actividad de la Li-TryR	178
2.6.2. Inhibición de la dimerización de la Li-TryR	182

2.7. Estudios de modelización molecular	187
2.7.1. Simulación de DM del monómero de la Li-TryR	188
2.7.2. Simulación de DM de los péptidos sobre el monómero	192
2.7.2.1. <i>Análisis de las interacciones del prototipo 2.01 con la proteína</i>	194
2.7.2.2. <i>Análisis de las interacciones de 2.06, 2.07, 2.34 (Glu2Ala) y 2.35 (Glu2Lys) con la proteína</i>	198
2.7.3. Cálculo de la energía libre de unión péptido–monómero de la Li-TryR	202
2.7.3.1. <i>Descomposición de la ΔG_{bind} por residuos para el péptido 2.35</i>	203
2.7.4. Modelo de interacción de 2.35 con la enzima	206
2.8. Bibliografía	208

3. CONCLUSIONES GENERALES 223

4. PARTE EXPERIMENTAL 229

4.1. Métodos generales	230
4.2. Productos comerciales	233
4.3. Preparación de los productos de partida en disolución	235
4.4. Protocolos generales en fase sólida	244
4.4.1. Seguimiento de las reacciones en fase sólida	244
4.4.2. Protocolos generales en la síntesis de péptidos lineales en fase sólida mediante estrategia Fmoc/tBu	244
4.4.2.1. <i>Soporte polimérico</i>	245
4.4.2.2. <i>Determinación de la carga de una resina tras unión del primer aminoácido</i>	245

4.4.2.3. Elongación de la cadena peptídica	246
4.4.2.4. Acetilación de aminas	247
4.4.2.5. Eliminación de los grupos protectores aliloxycarbonilo (Alloc) y grupos alilo (OAl).....	248
4.4.2.6. Desanclaje de la resina y sedimentación de los péptidos	248
4.4.2.7. Purificación de los péptidos	249
4.5. Síntesis y caracterización de inhibidores de la dimerización de la TI del VIH-1	250
4.5.1. Péptidos lineales y cíclicos con puentes hidrocarbonados	250
4.5.1.1. Síntesis de los péptidos lineales 1.22 – 1.24	250
4.5.1.2. Síntesis de los péptidos cíclicos 1.13 – 1.17	251
4.5.2. Péptidos lineales y cíclicos con puentes 1,2,3-triazol	258
4.5.2.1. Síntesis de los péptidos lineales 1.38 y 1.39	258
4.5.2.2. Síntesis de los péptidos cíclicos 1.18 y 1.19	260
4.5.3. Péptidos lineales y cíclicos con puentes amida.....	261
4.5.3.1. Síntesis de los péptidos cíclicos 1.20 y 1.21 mediante macrolactamización.....	262
4.6. Síntesis y caracterización de inhibidores de la dimerización de la Li-TryR	264
4.6.1. Síntesis de los péptidos grapados insaturados 2.06 y 2.07 mediante reacción de metátesis	264
4.6.2. Síntesis de los péptidos grapados saturados 2.08 y 2.09 mediante hidrogenación catalítica en disolución	265
4.6.3. Síntesis de los análogos lineales 2.30-2.35	269
4.7. Métodos para la determinación estructural	278
4.7.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)	278
4.7.1.1. Adquisición de las muestras	278
4.7.1.2. Asignación de RMN	278
4.7.1.3. Cálculo de estructura mediante el programa CYANA ...	279

4.7.2. Dicroísmo circular	279
4.8. Métodos de simulación de dinámica molecular.....	280
4.8.1. <i>Preparación de los sistemas teóricos.....</i>	280
4.8.2. <i>Definición de residuos no naturales y cofactores.....</i>	280
4.8.3. <i>Simulaciones de dinámica molecular</i>	280
4.8.4. <i>Cálculo de energías libres de interacción proteína-ligando</i>	281
4.8.5. <i>Análisis y visualización de los datos de las simulaciones de DM ..</i>	282
4.9. Ensayos biológicos.....	282
4.9.1. Ensayos de inhibición de la actividad oxidorreductasa de la Li-TryR	282
4.9.2. Ensayo de la dimerización de la TryR de <i>L. infantum</i>	283
4.10. Bibliografía	284

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se han utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB ("Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides", *Pure & Appl. Chem.* **1984**, *56*, 595-674. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid>)

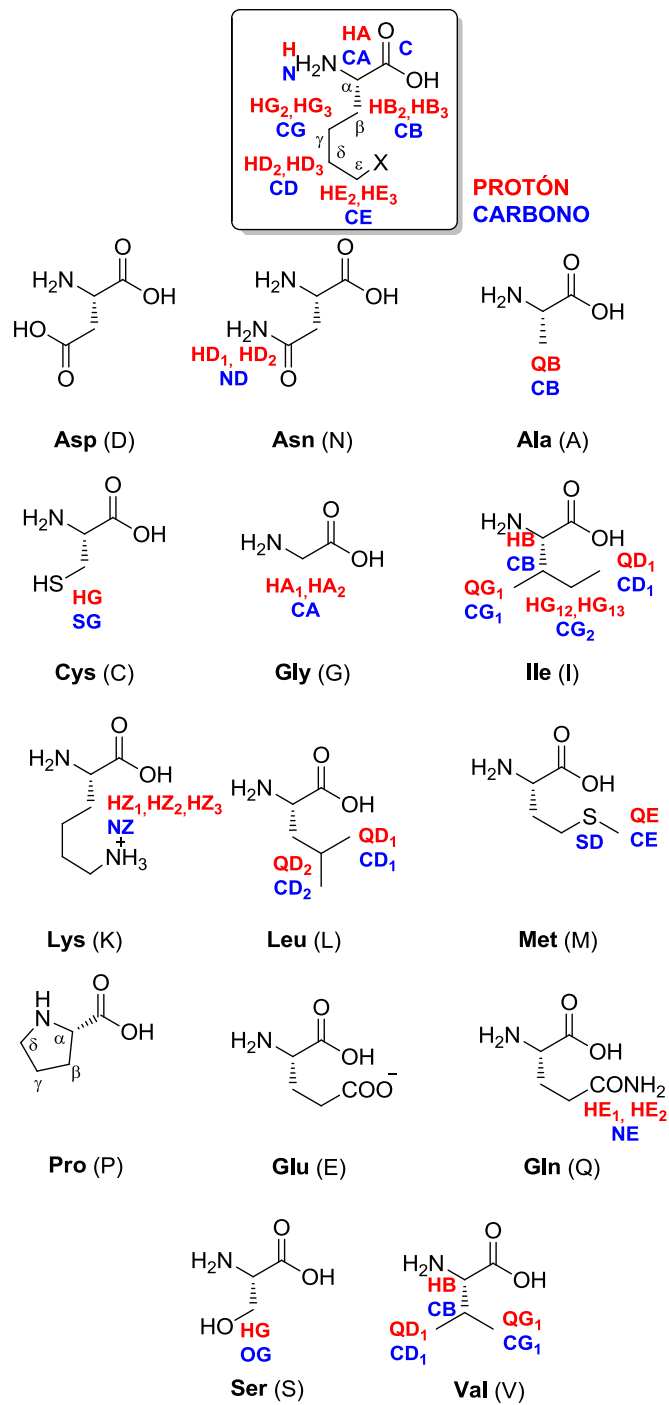
Los aminoácidos se han nombrado por el sistema de código de una y de tres letras y pertenecen a la serie natural L, salvo que se indique lo contrario. Las sustituciones en el grupo α -NH₂ se indican anteponiendo el símbolo aceptado para el sustituyente al símbolo del aminoácido mientras que las sustituciones en los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después, del símbolo del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina N-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina C-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo N-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo C-terminal.

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la parte experimental de la Memoria de esta Tesis Doctoral. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de con comas, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas desde su primera edición en octubre de 2005 (<http://buscon.rae.es/dpdI>).

L-AMINOÁCIDOS Y NOMENCLATURA UTILIZADA EN RMN



ABREVIATURAS EMPLEADAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en Guidelines for Authors (*J. Org. Chem.* **2008**, 73). Algunas abreviaturas menos frecuentes se indican a continuación:

Generales

AZT	Zidovudina
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CCTLC	Cromatografía circular centrífuga en capa fina
CuACC	<i>Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
2',3'-ddN	2',3'-didesoxinucleósidos
DM	Dinámica molecular
dNTP	Desoxitrinucleósido trifosfato
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FAD	<i>Food and Drug Administration</i>
GR	Glutation reductasa
HDMD2	<i>Human double minute 2</i>
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
HTS	Cribado de alto rendimiento (<i>High throughput Screening</i>)
IENN	Inhibidores específicos no nucleosídicos
IL-2	Interleucina-2
LC	Leishmaniasis cutánea
Li-TryR	Tripanotión reductasa de <i>Leishmania infantum</i>
LV	Leishmaniasis visceral
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAN	Fosfonatos de nucleósidos acíclicos
Pf-GR	Glutation reductasa de <i>Plasmodium falciparum</i>
PMEA	9-(2-fosfonometoxietil)adenina, Adefovir
PMPA	9-(<i>R</i>)-[2-(fosfonometoxi)propil]adenina, Tenofovir
IPPs	Interacciones proteína-proteína
PS	Poliestireno
RCM	<i>Ring-closing metathesis</i>
RuACC	<i>Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
SASA	<i>Solvent Accesible Surface Area</i>
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SPPS	<i>Solid Phase peptide synthesis</i>
SPR	Resonancia de plasmón de superficie (<i>Surface plasmon resonance</i>)

T(SH)₂	Tripanotión reducido
TAAE	Terapia antirretroviral de alta eficacia
TI	Transcriptasa inversa
¹H, ¹H-TOCSY	Espectroscopía de correlación total protón-protón
TryR	Tripanotión reductasa
TS₂	Tripanotión oxidado

Aminoácidos no naturales, grupos protectores y agentes de acoplamiento

Al, alil	Alilo
Alloc	Aliloxicarbonilo
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazolil-1-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio
Dap	Ácido 2,3-diaminopropiónico
DIPCDI	Diisopropilcarbodiimida
EDC	<i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilcarbodiimida
Hag	Homoalilglicina
HATU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)-tetrametiluronio
HCTU	Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
OAI	Aliloxi
Pra	Propargilglicina
PyAOP	Hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio

Reactivos y disolventes

AscNa	Ascorbato de sodio
DCM	Diclorometano
DIAD	Diisopropilazadicarboxilato
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina
EDT	1,2-etanoditiol
MBHA	4-metilbencihidrilamina
MTPA	Ácido 2-metoxi-2-fenil-2-trifluorometilacético
MTPACI	Cloruro de 2-metoxi-2-fenil-2-trifluorometilacetilo
TEA	Trietilamina
TFE	Trifluoroetanol
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico

ABSTRACT

PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE AND *LEISHMANIA INFANTUM* TRYPTOPHAN REDUCTASE AS THERAPEUTIC TARGET

Introduction

In the last years, special attention has been given to protein-protein interactions (PPIs) in the field of drug discovery. Organisms are highly regulated by a complex and diverse net of PPIs, which allow them to adapt or to interact adequately to the environment. Indeed, the molecular basis of a large variety of disorders is due to abolished, disrupted or not well established PPIs. However, some handicaps like the protein-protein interface topology as well as the need of more powerful techniques have limited until very recently the growth of PPIs as chemotherapeutic targets in the pharmaceutical sciences. On the contrary, in the last years an increasing number of new and potent molecules as PPIs modulators have already reached clinical phases.

Between different approximations, finding out those residues that have a significant contribution to the overall protein-protein interaction energy in multimeric complexes, has emerged as a useful tool in the development of PPIs modulators. The identification of these residues, named hot spots, has been validated as a good starting point within a rational design in Medicinal Chemistry.

As result of previous theoretical and experimental studies, our research group and collaborators identified two hot spots at dimer interfaces of both HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT, heterodimer) and *L. infantum* reverse transcriptase (Li-TryR, homodimer) as essential elements for their dimerization and catalytic stability: the $\beta 7/\beta 8$ loop of the HIV-1 RT p51 subunit and the residue Glu436 (located in α -helix of Li-TryR). These enzymes are essential for the survival of both the virus and the parasite. The former catalyzes the key step of the reverse

transcription of the viral RNA to DNA; the later keeps an optimal redox metabolism for the parasite.

As proof of concept, different peptides were designed and evaluated as PPIs inhibitors. Among them, **1.12** (Ac-cyclo^{1,6}[CINNEC]-NH₂) and **2.01** (Ac-PEIIQSVGISMKM-NH₂) were able of inhibit, in the micromolar range, the dimerization process of HIV-1 reverse transcriptase and *L. infantum*, respectively. These results provide an excellent onset in the search of new inhibitors.

Objectives

In the present Thesis, the author focuses on the design and synthesis of peptides and peptidomimetics derived from the hot spots named above, in order to inhibit monomer-monomer interactions of the dimeric enzymes as a novel therapeutic approach.

In Chapter 1, the design and synthesis of cyclic hexapeptides analogs of **1.12**, that mimic the $\beta 7/\beta 8$ loop of HIV-1 RT p51, are carried out (peptides **1.13-1.21**, Figure 1). Additionally, the effect of the covalent link over the structure of these peptides in solution is studied by NMR.

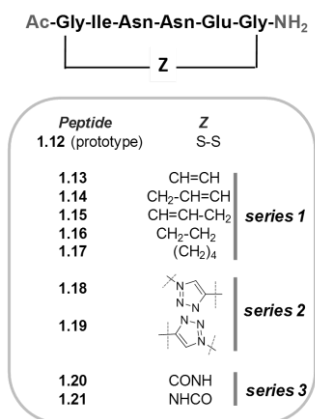


Figure 1

In Chapter 2, the author conducts the design and synthesis of 13-*mer* peptides that mimic the α -helix where the hot spot Glu436 is located at the dimer interface of Li-TryR (Figure 2). In particular, two series of derivatives are considered: a first one of stapled peptides (peptides **2.05-2.08**) and a second one of linear analogs (peptides **2.30-2.35**). Complementary, the secondary structure in solution of the stapled peptides is studied by circular dichroism as well as by NMR. Finally, all the peptides are evaluated as inhibitors of the activity and the dimerization process of Li-TryR.

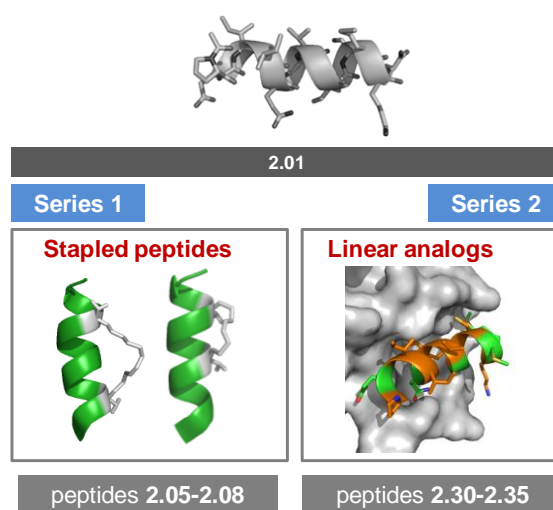


Figure 2

Results

The main results in Chapter 1 can be summarized as follows:

- The synthesis of three series of cyclic hexapeptides has been carried out: cyclic peptides with saturated and unsaturated hydrocarbon bridges (**1.13-1.17**, series 1), cyclic peptides with a ring of 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole (**1.18** and **1.19**, series 2) and two peptides with an amide as covalent linker (**1.20** and **1.21**, series 3).
- In all cases, the syntheses of the linear precursor as well as the cyclization step were performed using manual SPPS. Additionally, the different cyclation

routes have been optimized. For the metathesis reaction (series 1), the use of microwave irradiation allowed us to drastically reduce the reaction times and to increase the rate of conversion. In the cycloaddition reaction (series 2), catalyzed by Cu, the use of a base with higher pKa (piperidine in place of 2,4-lutidine) together with the use of microwave irradiation was important for optimizing the reaction.

- A conformational analysis by NMR in solution of the synthesized peptides has been performed. Their structure in solution has been calculated using the program CYANA. In all cases, the peptides adopt a unique and mayor conformation in solution. However, some differences are observed when these peptides are compared to the $\beta 7/\beta 8$ loop of HIV-1 RT p51. Among all of them, peptide **1.17** (with a covalent linker of five saturated methylenes) shows the best fitting (RMSD 0.2).

The main results in [Chapter 2](#) can be summarized as follows:

- The design of the best position for stapling the peptide **2.01** was performed using a theoretical prediction of the degree of helicity of the peptides in a water box. As result, positions 4 and 11 (staple i,i+7) and positions 4 and 8 (staple i,i+4) were chosen. In all cases, Met residues were changed to Nle in order to avoid potential oxidation problems.
- For the synthesis of the peptides of the series 1, it was necessary, first, the asymmetric synthesis of quaternary amino acids (*S*)-**2.02** and (*R*)-**2.05**. The absolute configuration of these amino acids was determined by derivatization to their corresponding Mosher amide and subsequent NMR study thus obtaining enantiomeric excesses above 95%.
- A structural study in solution by circular dichroism as well as by NMR has been performed with the stapled peptides of series 1. Introducing a covalent bond between two residues of the peptide sequence of **2.06a** (i, i +7) and **2.07** (i, i +4) has resulted in a α -helix structured peptide in aqueous solution, in the absence of protein, in contrast to the linear prototype **2.01**, which under these conditions is found unstructured. Additionally, NMR studies show that a

covalent link between positions 4 and 11 (peptide **2.06a**) provides a peptide with better structure than when the covalent link is between positions 4 and 8 (**2.07**).

- Synthesized peptides have been evaluated *in vitro* as Li-TryR oxidoreductase activity inhibitors as well as inhibitors of its dimerization process. The increase activity observed in some of the stapled peptides compared to the linear prototype is due to the substitution of Met by Nle residues and not to a covalent closure beneficial effect on activity. Among the linear analogs series, peptide **2.35** (where Glu2 has been replaced by a Lys residue) resulted in the most active compound synthesized to date ($IC_{50} = 1.8 \pm 0.3 \mu M$). Moreover, **2.35** also inhibits the dimerization of Li-TryR with better IC_{50} values than the prototype.
- Finally, and with the aim to rationalize the activity results, dynamic simulations of some of the synthesized peptides with the monomer of the Li-TryR were performed. The results show that introduction of Lys residue in position 2 of the peptide results in a stable anchor that interacts with Glu436 and Asp432 of the monomer. The fact that the Glu436 residue is key to the stability of the dimer Li-TryR could explain the best results of inhibition of enzyme activity as well as the dimerization of the Li-TryR observed for the initial prototype **2.01**. Finally, a model of interaction of **2.35** in the dimerization interface of the enzyme is proposed.

Conclusions

In this thesis it has been carried out the design and synthesis of inhibitors of PPIs of two dimeric enzymes: HIV-1 reverse transcriptase and Li-TryR with the aim of exploring a novel, alternative and unexplored mechanism of inhibition. In Chapter 1, the synthesized peptides **1.13-1.21** showed a structure similar to that of the $\beta 7/\beta 8$ loop of p51 subunit in the native protein (HIV-1 RT). In Chapter 2, from the two series of synthesized peptides, linear peptide **2.35** proved to be more potent than prototype **2.01**. These results and the proposed model of interaction of **2.35** with the enzyme represent an excellent starting point for the future design of new inhibitors of the dimerization process of Li-TryR.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las interacciones proteína–proteína como diana terapéutica

En la naturaleza, todos los organismos vivos cuentan con mecanismos de regulación como elementos clave para el control de sus funciones básicas. Muchos de estos procesos están controlados por proteínas que frecuentemente actúan en procesos concertados con otras proteínas mediante interacciones proteína-proteína (IPPs)¹. Por ejemplo, cuando una célula se expone a un estímulo dado se genera una respuesta intracelular que permite a ésta adaptarse a su entorno. Este proceso, conocido como transducción de señal, ubicuo en todo tipo de células, es la base sobre la que se asientan la práctica totalidad de los procesos bioquímicos, tales como el control de la expresión de genes, el reconocimiento celular o la división y crecimiento celulares.

Debido al papel relevante de las IPPs en la homeostasis de los sistemas biológicos, su disfunción está ligada al desarrollo de diversas patologías, como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas² y las infecciones virales y bacterianas. De hecho, muchas de las enfermedades que afectan a los humanos se pueden asociar a IPPs aberrantes, bien por la pérdida de una interacción esencial o bien debido a la formación de complejos proteicos a una concentración, tiempo o localizaciones inapropiados.

La modulación selectiva de las IPPs con moléculas pequeñas es un área de gran interés en las ciencias farmacéuticas y abre nuevas posibilidades en el descubrimiento de fármacos frente a diversas enfermedades. Así, por ejemplo, en lo que respecta al cáncer, existen diversos compuestos naturales, semisintéticos y sintéticos en clínica que afectan a las IPPs de la tubulina ejerciendo un efecto antitumoral. Esta proteína, formada por las subunidades α y β , polimeriza en forma de microtúbulos, los cuales experimentan procesos dinámicos continuos de polimerización y despolimerización ligados al ciclo celular. Este proceso dinámico es esencial en diversos procesos biológicos, incluyendo la división celular.

La naturaleza nos brinda dos buenos ejemplos de moléculas que actúan modulando dichas interacciones proteína-proteína. Un caso relevante lo constituyen la familia de los taxanos³, derivados del taxol (*paclitaxel*), empleados hoy en día en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. El taxol, que se une al monómero β de la tubulina (Figura 1), estabiliza los microtúbulos fortaleciendo las IPPs (impidiendo la despolimerización) e inhibiendo la división celular⁴, lo que conduce finalmente a la apoptosis. En contraste al taxol, la colchicina (también un producto natural) y sus análogos desestabilizan los microtúbulos (inhibiendo la polimerización), interaccionando con la β -tubulina en la interfaz entre los dos monómeros de tubulina⁵ (Figura 1).

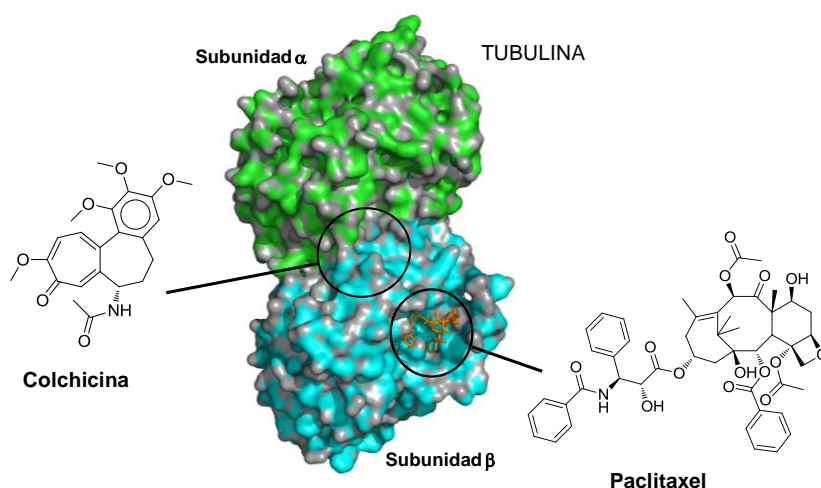


Figura 1 | Estructura y sitios de unión de paclitaxel y colchicina en la tubulina.

Desarrollo de moduladores de IPPs

Hasta hace algunos años, se ha considerado el desarrollo de moléculas pequeñas capaces de interferir IPPs como un reto difícil, debido a que las interfaces proteicas que intervienen en las IPPs suelen ser planas, de gran tamaño (~1500–3000 Å) y carecen de bolsillos, oquedades o cavidades claramente definidas que permitan predecir un potencial sitio de unión de un inhibidor de un agonista o un antagonista como ocurre en dianas clásicas (enzimas o receptores)⁶. De hecho, cuando se analizan estas regiones proteicas desde el punto de vista clásico de *druggability*⁷ (término introducido por Hopkins y Groom en el año 2002⁸ y que se definiría como la potencialidad de una diana determinada para que un fármaco se una a ella con alta afinidad provocando una respuesta terapéutica) suelen ser consideradas como dianas no tratables. Sin embargo, el desarrollo a lo largo de los últimos 20 años de nuevas tecnologías y estrategias para el estudio de las IPPs ha cambiado dicha percepción y actualmente la búsqueda de moduladores de IPPs es un área viable y en auge⁹. Ya existen ejemplos de este tipo de inhibidores en distintas fases clínicas¹⁰, como se comentará más adelante.

El desarrollo de moduladores de IPPs, dada la complejidad intrínseca de los mismos, requiere de aproximaciones metodológicas innovadoras y necesita ser abordado desde un punto de vista interdisciplinar que conjugue los campos de la biología estructural, la bioquímica, la genómica, y la química médica y computacional. Así, el desarrollo de inhibidores de IPPs sigue siendo un reto, aunque abordable. Aunque las IPPs se distribuyen a lo largo de toda la interfaz proteína–proteína, un modulador de dichas interacciones no necesitaría abarcar toda la superficie de interacción. De hecho, se conoce que en muchos casos sólo pequeños segmentos de la interfaz contribuyen a la energía de unión con alta afinidad. Dichos segmentos se conocen como *hot spots*¹¹. Por tanto, se puede pensar que las pequeñas cavidades y protuberancias definidas por dichos *hot spots* puedan ser mimetizadas o consideradas como puntos de interacción de moléculas pequeñas. Este tipo de residuos, cuya denominación fue acuñada en 1995 por Clarkson y Wells¹², son críticos para la estabilidad de los complejos

proteicos, tal y como se ha demostrado mediante experimentos de mutagénesis dirigida, cromatografía de exclusión molecular o espectroscopía de fluorescencia. Actualmente la predicción de *hot spots* de IPPs se ha convertido en una herramienta elemental y fundamental en la búsqueda de moduladores de interacciones proteína-proteína.

Los moduladores de IPPs presentan ventajas respecto a los inhibidores de dianas *clásicas*. Así, por un lado, al interaccionar con una interfaz proteína-proteína específica, serían más selectivos y menos tóxicos ya que no afectarían (*a priori*) a proteínas y enzimas del huésped que no contendrían dichos *hot spots*. Por otro lado, serían además menos proclives al desarrollo de resistencias ya que la estos segmentos están definidos en la mayoría de los casos por residuos conservados.

Algunas estrategias para el descubrimiento de moduladores de IPPs

El conocimiento de la estructura tridimensional de los complejos proteína-proteína permite utilizar aproximaciones de diseño racional en la búsqueda de moduladores efectivos de dichas interacciones. En primer lugar, se debe analizar la interfaz de interacción de los complejos proteína-proteína para identificar los potenciales *hot spots*. El siguiente paso sería la validación del(los) *hot spot(s)* de forma experimental, por ejemplo, mediante estudios de mutagénesis dirigida, donde se sustituyen los residuos potencialmente claves en la proteína por otro de naturaleza neutra (normalmente por Ala) para evaluar a continuación la estabilidad estructural y funcional del mutante. Confirmada entonces la importancia de (los) residuo(s) para la estabilidad del complejo proteico, se pueden seleccionar péptidos minimalistas derivados de estos *hot spots* como herramienta para la prueba de concepto.

Ya que en las interfaces de contacto proteína-proteína se encuentran todos los elementos de estructura secundaria comunes en proteínas, como son las hélices α , las láminas β y los giros inversos, y muchos de ellos forman parte de *hot spots*, una estrategia bastante utilizada es el diseño de miméticos de dichos elementos

de la estructura secundaria. Para ello se pueden diseñar péptidos conformacionalmente restringidos¹³ (por ejemplo, mediante ciclación) o bien se puede abordar el diseño de esqueletos moleculares (*scaffolds*) no peptídicos adecuados que puedan ser decorados con los residuos esenciales en la unión previamente identificados. Cabe señalar, por ejemplo, los antagonistas de la interacción p53/HDM2¹⁴, implicados en procesos tumorales y los moduladores, con actividad *in vivo*, del proceso de apoptosis regulado por la familia de proteínas Bcl-2¹⁵, ambos miméticos de una hélice α descritos por Verdine y colaboradores¹⁶.

Asimismo, se podría generar un modelo farmacofórico 3D¹⁷ a partir de una serie de péptidos bioactivos, o se podría abordar un cribado virtual de quimiotecas una vez definidos los *hot spots* de la interfaz de interacción de las proteínas nativas así como un diseño *de novo*, diseño por fragmentos, etc. Todas estas aproximaciones son estrategias habituales en la búsqueda y optimización de fármacos en Química Médica.

Otras estrategias complementarias para el descubrimiento de moduladores de IPPs, son las metodologías empíricas de cribado de alto rendimiento (HTS, del inglés *high-throughput screening*) llevado a cabo principalmente en el seno de la industria farmacéutica, tanto de bases de datos de fragmentos como *screening* tradicional de quimiotecas de moléculas pequeñas¹⁸. Estas estrategias son útiles también en aquellos casos en los que no se tiene información estructural de la diana terapéutica. A pesar de que el porcentaje de *hits* obtenidos a partir de HTS en el caso de interfaces proteicas es menor que para dianas clásicas, se han descrito ejemplos relevantes de moléculas pequeñas que son moduladores de IPPs, que tras ser optimizadas, se encuentran en fases clínicas en la actualidad. Así, por ejemplo, surgieron la familia de las nutlinas, identificadas por la empresa Hoffman-La Roche, en un cribado de alto rendimiento de IPPs entre la proteína pro-apoptótica p53 y su regulador negativo HDM2 (del inglés *human double minute 2*). Tras un proceso de optimización, la molécula más potente (*nutlina-3*), mostró una potencia inhibitoria en el orden nanomolar frente al complejo p53/HDM2 (Figura 2). Actualmente este compuesto se encuentra en fase clínica I para el tratamiento del retinoblastoma.

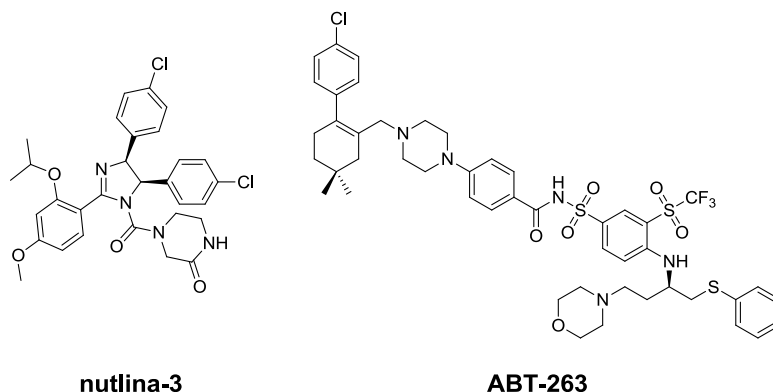


Figura 2 | Estructuras de nutlina-3 y ABT-263, ejemplos de moléculas pequeñas capaces de inhibir IPPs que se encuentran en fases clínicas.

Finalmente, otro ejemplo reciente en los moduladores de IPPs que se encuentran en fase clínica, es el descrito frente a las proteínas de la familia de Bcl-2^{9, 19}, las cuales están sobreexpresadas en diversos tipos de cáncer. Esta familia interviene en la regulación celular mediante la formación de homo y heterodímeros a través de IPPs entre proteínas de la misma familia, generándose complejos entre elementos pro y/o anti-apoptóticos. Se han desarrollado moléculas pequeñas como ABT-263^{19c} (Abbott, EE UU) (Figura 2), de elevada afinidad debido a la interacción en un bolsillo o cavidad transitoria de la interfaz de contacto proteína-proteína que no estaba presente en el complejo proteico. La flexibilidad de las superficies de contacto y la posible formación de este tipo de *transient pockets* abre nuevas posibilidades para la búsqueda de moduladores efectivos de IPPs. Actualmente, este compuesto se encuentra en fase clínica I/II para el tratamiento de neoplasias linfoides refractarias y en fase clínica II para el tratamiento combinado con *rituximab* frente a la leucemia linfática.

OBJETIVOS GENERALES

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general el diseño y síntesis de péptidos y peptidomiméticos como inhibidores de interacciones proteína-proteína de dos enzimas diméricas validadas como dianas terapéuticas e implicadas en enfermedades infecciosas: la transcriptasa inversa (TI) del virus de Inmunodeficiencia Humana 1 (VIH-1) y la tripanotión reductasa (TryR) del parásito *Leishmania infantum*. La primera (TI del VIH-1) es esencial para la replicación viral y la segunda (Li-TryR) es clave en el metabolismo redox del parásito. Ambas dianas suponen un punto de ataque selectivo ya que no están presentes en la célula huésped.

Para conseguir este objetivo se han diseñado péptidos que mimetizan la estructura secundaria de *hot spots* previamente identificados en nuestro grupo de investigación en cada enzima.

En el Capítulo 1 se aplica esta estrategia al diseño y síntesis de péptidos cíclicos de un péptido prototipo mimético del asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 de la TI del VIH-1 (heterodímero p66/p51). Para ello se exploran diferentes tipos de cierres covalentes y se estudia el efecto de dicho cierre sobre la estructuración de estos péptidos en disolución.

En el Capítulo 2 se lleva a cabo el diseño y síntesis de péptidos miméticos de una hélice α presente en la interfaz de dimerización de la TryR de *L. infantum* (homodímero). Se describen la síntesis de péptidos tanto conformacionalmente restringidos como lineales, su estudio estructural en disolución mediante técnicas experimentales y su evaluación biológica. Finalmente, se llevará a cabo un intento de racionalización de los resultados obtenidos mediante simulación de dinámica molecular y cálculo teórico.

Los objetivos más concretos se detallan al principio de cada capítulo de la presente Tesis Doctoral.

1

Péptidos cíclicos como inhibidores de la TI del VIH-1

1.1. Introducción

Desde que en el año 1981 se identificara el primer caso del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)²⁰, esta enfermedad ha llegado a ser una de las epidemias más globalizadas en la historia reciente de la humanidad. Aunque en muchos países industrializados el acceso a fármacos antirretrovirales está garantizado, hecho que hace que se considere al SIDA como una enfermedad crónica, la epidemia constituye todavía la tercera causa de mortalidad debida a enfermedades infecciosas. Más aún, en muchos países del África Subsahariana la situación es más que preocupante ya que en 2010 el 70% de las nuevas infecciones se registraron en esta zona, región donde vive la mayoría de la población infectada por VIH-1²¹.

El término SIDA define el estadio final de un cuadro patológico de inmunodeficiencia profunda causado por la pérdida de una subpoblación de

linfocitos T, los T-4, que deja al paciente a merced de numerosas infecciones oportunistas de origen bacteriano, protozario, fúngico o viral²². El aislamiento (1983) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) como el agente etiológico del SIDA²³, y su identificación (1984) como un miembro de la familia de los retrovirus, ha estimulado enormemente la búsqueda de agentes capaces de bloquear la replicación del virus y frenar así la enfermedad.

Actualmente no existe ningún tratamiento para la cura definitiva del SIDA. En su defecto, la estrategia más efectiva se basa en una combinación de tres o más fármacos frente a, principalmente, dos enzimas virales: la transcriptasa inversa (TI) y la proteasa, lo que se conoce como terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE, en inglés HAART)²⁴. El empleo de estos *cócteles* de fármacos reduce la carga viral en los pacientes hasta valores indetectables durante largos períodos de tiempo (meses e incluso años) lo que ha contribuido a disminuir espectacularmente la morbilidad y mortalidad de las personas infectadas²⁵. Sin embargo, el que estos fármacos presenten efectos tóxicos secundarios junto con la rápida aparición de cepas de virus resistentes a éstos, hace necesario el acceso a moléculas más potentes y efectivas así como a nuevas aproximaciones para combatir esta enfermedad^{23b}.

Recientemente, se han realizado avances significativos en el desarrollo de una vacuna para el tratamiento del SIDA. Dentro de los distintos tipos de vacunas que se están ensayando, el grupo liderado por el español Mariano Esteban (CBM, CSIC) ha ensayado con éxito una variante atenuada del virus vacuna Ankara (MVA), en la que se han insertado los genes *gag*, *pol*, *nef* y *vir* del subtipo B del VIH-1, en un estudio con humanos en fase clínica I como una potencial vacuna frente al VIH-1²⁶. Así, cerca del 90% de los 30 pacientes que participaron en el ensayo, desarrollaron una respuesta inmunológica intensa frente al VIH, manteniendo el 85% de ellos estos niveles de respuesta durante al menos un año.

1.1.1. Estructura y genoma del VIH

El VIH se clasifica dentro del género de los lentivirus (familia Retroviridae) (Figura 1.1). Su genoma está codificado en forma de (+)-ARN monocatenario.

Cada virión presenta envoltura y cápsida y porta dos hebras idénticas de (+)-ARN que codifican las 19 proteínas virales esenciales para la reproducción del virus. Además, en el virión también están presentes las enzimas virales transcriptasa inversa (TI), integrasa (IN) y proteasa (PR), así como otras proteínas llamadas p6 y p7. La cápsida está formada por unidades repetidas de p24 y está rodeada por una proteína de matriz (p17) y por una envoltura de membrana, originaria del organismo hospedador, y que contiene las glicoproteínas virales gp41 y gp120.

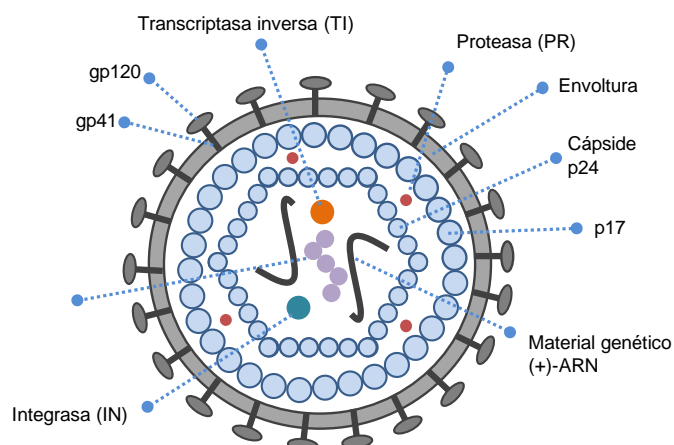


Figura 1.1 | Representación esquemática de un virión maduro del VIH-1 y sus componentes.

Hasta el momento se han aislado dos subtipos del VIH capaces de producir SIDA y que se han denominado VIH tipo 1 y tipo2 (VIH-1 y VIH-2, respectivamente). El VIH-1 se encuentra diseminado por todos los continentes mientras que el VIH-2 es el virus responsable del SIDA en la zona de Costa de Marfil y países limítrofes y es menos virulento e infeccioso que el VIH-1. Ambos virus difieren en su secuencia genómica, propiedades antigénicas y tamaño de sus proteínas²⁷.

1.1.2. Ciclo replicativo del VIH-1 y estrategias terapéuticas

En la Figura 1.2 se muestra un esquema para el ciclo replicativo del VIH-1. Este comienza cuando el virus a través de su glicoproteína viral gp120

interacciona con los receptores CD4 de la célula, presentes en la superficie de los linfocitos T. Es entonces, cuando gp120 experimenta un cambio conformacional que permite una interacción adicional del virus con los co-receptores CCR5 y CXCR4 del linfocito T, anclándose finalmente a la membrana celular a través de la proteína viral gp41. A continuación, se da el proceso de fusión de membranas, y las enzimas y genoma virales son liberados al citoplasma. Ya que el ARN no puede integrarse directamente en el genoma celular (codificado en forma de ADN), es necesaria la participación de la TI para la biosíntesis de ADN bicatenario proviral a partir del (+)-ARN monocatenario como molde, gracias a sus actividades ADN polimerasa ADN/ARN dependientes y ARNasa H. El ADN proviral es entonces introducido en el genoma celular en un proceso catalizado por la integrasa. Cuando la célula se encuentra en este estado, se habla de *provirus*, un estado latente que puede prolongarse en el tiempo, hasta que una señal de activación dada ocurra. En ese caso, los genes del VIH serían expresados por la maquinaria de la célula huésped en forma de los polipéptidos virales no funcionales. Por último, tras el procesamiento post-traducciona l y el empaquetado de los viriones, se daría la lisis celular, con la consiguiente liberación de los nuevos virus al torrente sanguíneo y/o linfático.

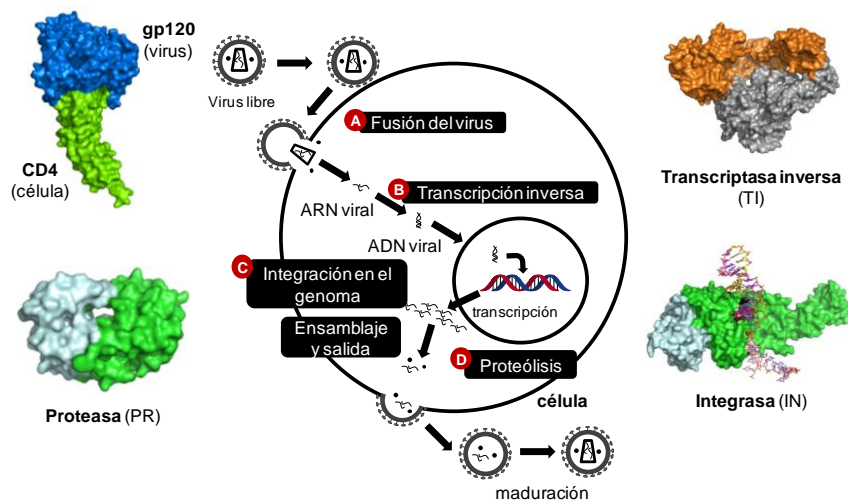


Figura 1.2 | Ciclo replicativo del VIH-1 y principales dianas terapéuticas en el tratamiento de la infección por VIH-1.

Las estrategias farmacológicas consideradas para el tratamiento del SIDA hasta la fecha, se han centrado en la inhibición de alguna de las etapas del ciclo replicativo del virus descritas anteriormente²⁸ (Figura 1.2): la fusión y entrada del virus (A), el proceso de transcripción inversa (B), el proceso de integración del ADN viral en el genoma de la célula (C) y el proceso de proteólisis de los precursores peptídicos virales (D).

Los inhibidores de fusión y entrada del virus actúan en las etapas tempranas del ciclo viral²⁹. En 2003 fue aprobado la *enfuvirtida*³⁰ (**1**, Fuzeon, Roche) como el primer miembro de una nueva clase de inhibidores de fusión (Figura 1.3). Este polipéptido de 36 residuos interacciona con la proteína viral gp41, lo que evita la creación de un poro en la membrana celular para la entrada del virus. En el año 2007 se aprobó el segundo inhibidor de entrada del virus, *maraviroc* (**2**, Pfizer) como antagonista de los co-receptores celulares CCR5, impidiendo la interacción con gp120. Otra de las dianas clásicas en el tratamiento del VIH-1 lo constituye la enzima viral PR³¹. Esta enzima homodimérica cataliza la proteólisis de la cápsida del virus tras su entrada en la célula así como el procesamiento post-traducciona de los polipéptidos virales no funcionales, precursores de las distintas proteínas virales. Desde que en 1995 se aprobó el primer inhibidor de la proteasa, el *saquinavir* (**3**, Roche), se han desarrollado más de 10 nuevos inhibidores. Ejemplos recientes como *darunavir* (**4**, Janssen & Johnson, 2006) o *triplanavir* (**5**, Boehringer Ingelheim, 2005) se recogen en la Figura 1.3.

En el año 2007 se aprobó el *raltegravir*³² (**6**, Merck) como el primer inhibidor de la integrasa del VIH-1. Este fármaco pionero presenta un sistema cetoenólico que permite quelar de forma efectiva los dos iones de Mg^{2+} presentes en el centro activo de la enzima.

Por último, la inhibición del proceso de transcripción inversa ha merecido gran atención por parte de la comunidad científica, debido a que es una enzima viral esencial y exclusiva de retrovirus como el VIH. A continuación se aborda esta diana en más detalle.

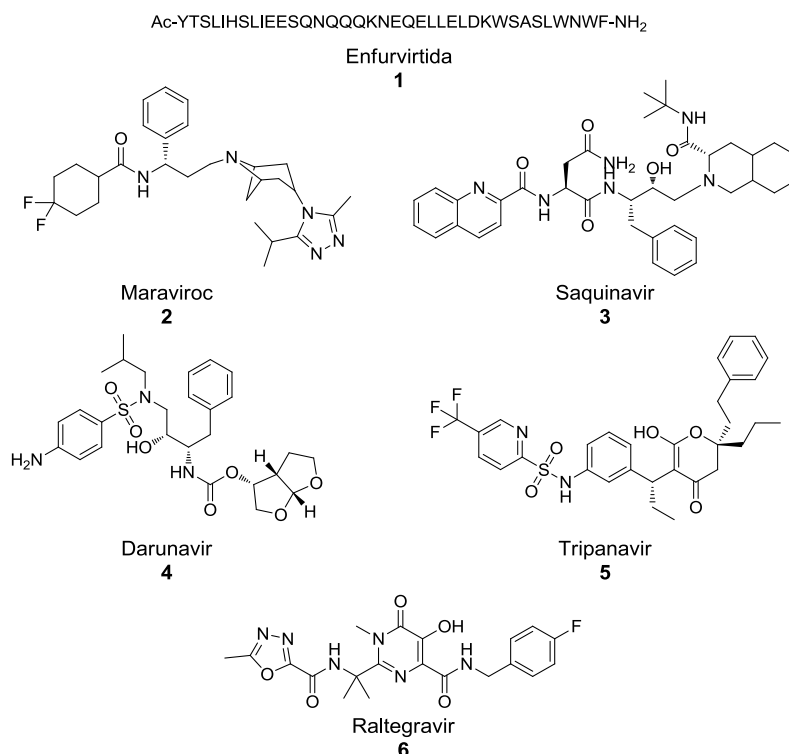


Figura 1.3 | Ejemplos de fármacos aprobados para el tratamiento del SIDA frente a la fusión del virus (1 y 2), a la proteasa (3–5) y la integrasa (6).

1.1.3. La Transcriptasa Inversa como diana terapéutica

La TI de VIH-1 es una enzima multifuncional con actividades concertadas ADN polimerasa ADN/ARN dependiente y ARN hidrolasa (ARNasa H) (EC 2.7.7.49). La forma activa de la enzima es un heterodímero asimétrico formado por dos subunidades, una de 66 KDa y otra de 51 KDa (denominadas p66 y p51, respectivamente)³³ (Figura 1.4). En la subunidad p66 residen las actividades polimerasa y ARNasa H, mientras que la subunidad p51 actúa como soporte estructural de la subunidad p66, estabilizando la conformación activa de dicha subunidad facilitando así la unión del ADN a la misma. El análisis estructural de la enzima revela que el dominio polimerasa de la subunidad p66 presenta una estructura altamente conservada en forma de mano derecha semicerrada, basado en dedos (residuos 1-85 y 118-155), palma (residuos 86-117 y 156-237) y pulgar

(residuos 238-318). Además, esta subunidad presenta los dominios ARNasa H (residuos 427-560) y un dominio conexión (residuos 319-426)³⁴ que conecta las dos regiones funcionales de p66. La gran hendidura de la palma deja expuesto el centro activo (sitio de unión de esta subunidad) el cual está formado por una tríada catalítica de residuos de ácido aspártico (Asp110, Asp185 y Asp186)³⁵.

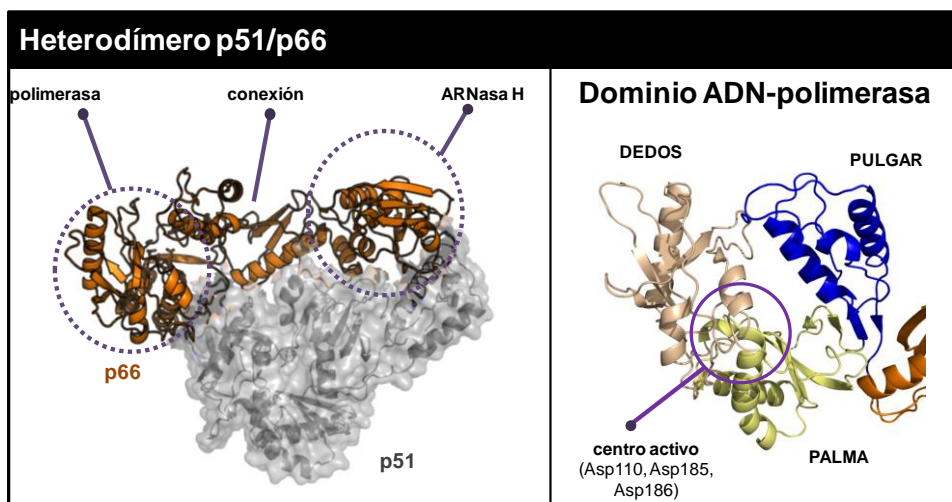


Figura 1.4 | Estructura secundaria de la TI del VIH y detalle del dominio ADN polimerasa.

La subunidad p51 carece de dominio ARNasa H, y aunque también presenta los cuatro subdominios del dominio polimerasa de p66, se pliega de forma distinta a lo que hace la subunidad mayor: mientras que en p66 recaen las funciones enzimáticas del heterodímero, p51 sirve de soporte y anclaje de la conformación biológicamente activa de p66.

Para que la TI sea catalíticamente eficaz es absolutamente necesario que se constituya en forma dimérica³⁶ (Figura 1.5). Se ha propuesto un modelo en dos etapas para el proceso de dimerización de la TI en el cual la forma dimérica se encuentra en equilibrio con los monómeros inactivos³⁷. El primer paso del proceso es una asociación concentración-dependiente de las dos subunidades (p66 y p51) para dar un intermedio heterodimérico inactivo, que isomeriza lentamente, en un segundo paso, a la forma heterodimérica madura de la enzima que ya posee actividad enzimática. Desde un punto de vista estructural, el primer paso de

asociación se produce en la interfaz de dimerización p66/p51 a través de la interacción entre los denominados subdominios de conexión, en concreto en una zona rica en triptófanos, mientras que en el cambio conformacional posterior, se produce un movimiento de los subdominios pulgar y dedos de la subunidad p51 sobre los subdominios de ARNasa H y palma respectivamente de la subunidad p66.

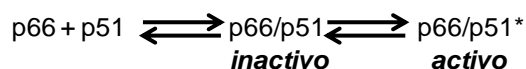


Figura 1.5 | Mecanismo de dimerización propuesto para la TI del VIH-1 en dos etapas.

1.1.4. Inhibidores de la TI del VIH-1

Hasta la fecha, los fármacos inhibidores de la TI aprobados para el tratamiento del SIDA pueden agruparse en dos grandes familias atendiendo a su mecanismo de inhibición: análogos del sustrato e inhibidores específicos no nucleosídicos (IENN).

Análogos de sustrato (2',3'-ddN y PAN)³⁸.

En esta primera familia se incluyen los inhibidores 2',3'-didesoxinucleosídicos (2',3'-ddN) y los inhibidores nucleotídicos o fosfonatos de nucleósidos acíclicos (PAN). Los primeros fármacos aprobados para el tratamiento del SIDA en los años 80s (Figura 1.6) pertenecen al primero de los grupos de inhibidores. Así, la *zidovudina*³⁹ (**7**, AZT) o la *didanosina* (**8**, ddi) son ejemplos de 2',3'-ddN, donde se ha sustituido el grupo hidroxilo de la posición 3' del azúcar por una azida o por un hidrógeno, respectivamente. Por otro lado, *adefovir*⁴⁰ (**9**) y *tenofovir*⁴¹ (**10**) son ejemplos de inhibidores PAN, en los que se ha reemplazado el anillo de desoxirribosa por un grupo alifático de 2-hidroxietilo (PMEA) o 2-hidroxipropilo (PMPA) funcionalizados con un grupo fosfonato. En la Figura 1.6 se recogen, además, otros ejemplos de estas dos familias aprobadas para uso clínico. Todos los análogos de sustrato comparten un mecanismo común de

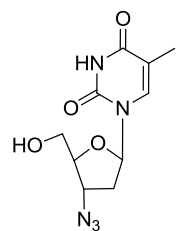
inhibición de la TI. En primer lugar, para inhibir a la enzima, deben ser fosforilados por las quinasas celulares a sus derivados 5'-trifosfato. Los ddNTPs actúan como inhibidores competitivos del sustrato natural de la enzima (trifosfatos de desoxinucleósidos, dNTPs). Además, los 2',3'-ddNTP pueden comportarse como sustratos alternativos, de modo que al ser incorporados a la cadena de ADN en formación, y carecer del 3'-OH necesario para la elongación, actúan como terminadores de cadena del ADN proviral. Actualmente, se dispone de ocho 2',3'-ddN y de dos inhibidores de la familia PAN aprobados para uso clínico.

Los 2',3'-ddN no discriminan en su acción antiviral entre el VIH-1 y otros retrovirus como el VIH-2, VIS (virus de inmunodeficiencia en simios) o el VIF (virus de inmunodeficiencia felina). Por otro lado, los PAN inhiben también la replicación de diversos virus ADN, tales como virus herpes o adenovirus, lo que los convierte en unos compuestos de amplio espectro antiviral.

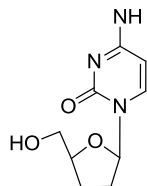
Inhibidores específicos no nucleosídicos (IENNs).

La segunda familia la constituyen los inhibidores específicos de naturaleza no nucleosídica (IENNs) de la TI del VIH-1. Estas moléculas son inhibidores alostéricos que ejercen un tipo de inhibición no competitiva respecto al sustrato y al molde cebador. El sitio de unión de los IENNs es un bolsillo hidrófobo flexible de la TI cercano al sitio activo de la enzima, pero distinto, y que se forma sólo en presencia del inhibidor. La unión del inhibidor lleva a un cambio conformacional en la enzima, distorsionando la tríada catalítica de Asp del centro catalítico, lo que impide la síntesis del ADN viral. Hasta la fecha se han descrito tres generaciones de IENNs (Figura 1.7).

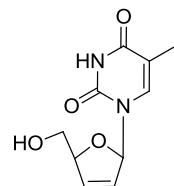
La primera generación la constituyen *nevirapina*⁴² (**17**, nevirapina, Boehringer Ingelheim) y *delavirdina*⁴³ (**18**, Pfizer), aprobados para el tratamiento del SIDA por la FDA en los años 1996 y 1997, respectivamente. Sin embargo, bajo la presión de estos fármacos se han desarrollado rápidamente cepas de virus resistentes⁴⁴.



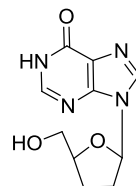
Zidovudina (AZT)
7



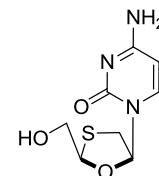
Zalcitabina (ddC)
8



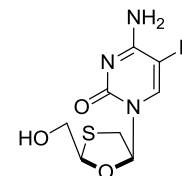
Estavudina (d4T)
9



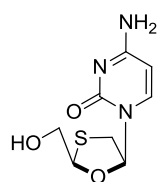
Didanosina (ddI)
10



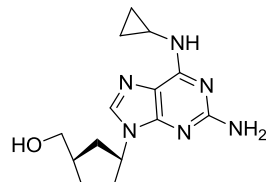
Lamivudina (3TC)
11



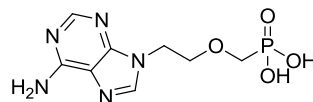
Emtricitabina [(-)-FTC]
12



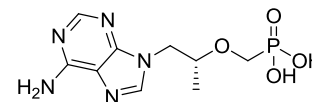
Lamivudina (3TC)
13



Abacavir (ABC)
14



Adefovir (PMEA)
15



Tenofovir (PMPA)
16

Figura 1.6 | Ejemplos de 2',3'-ddN (**7–14**) y PAN (**15 y 16**) aprobados para uso clínico.

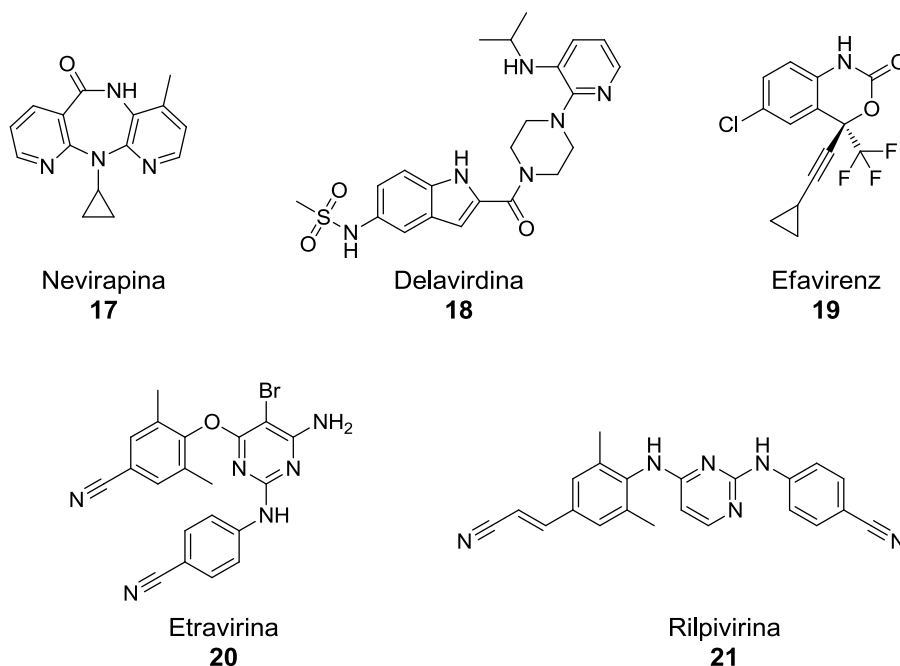


Figura 1.7 | IENNs aprobados para el tratamiento del SIDA.

Como segunda y tercera generación de IENNs, se han desarrollado *efavirenz* (**19**, Bristol-Myers Squibb), *etravirina*⁴⁵ (**20**, Tibotec) y *rilpivirina*⁴⁵ (**21**, Jannseen Phamaceuthicals, Inc.), aprobada esta última en 2011 (Figura 1.7). A diferencia de los IENNs de primera generación, estos fármacos necesitan dos o más mutaciones en la TI para una pérdida considerable en su potencia⁴⁴. Este hecho reside en su modo diferencial de interacción con el bolsillo alostérico donde se unen estos inhibidores. Así, mientras que los IENNs de primera generación (*nevirapina* (**17**) y *delavirdina* (**18**)) adoptan una conformación de *mariposa* interaccionando fundamentalmente con los residuos Tyr181 y Try188, se ha observado en estructuras cristalinas resueltas por difracción de rayos X que fármacos como *etravirina* o *rilpivirina* se disponen en forma de *herradura*, haciendo un uso más extenso del bolsillo hidrófobo, y por tanto, aumentando el número de interacciones implicadas⁴⁴ (Figura 1.8). Asimismo, se ha propuesto que estos inhibidores presentan una mayor flexibilidad que los fármacos de primera generación, lo que les ayudaría a readaptarse de manera eficaz a las mutaciones

en el bolsillo de unión, estableciendo nuevos contactos con los residuos del bolsillo.

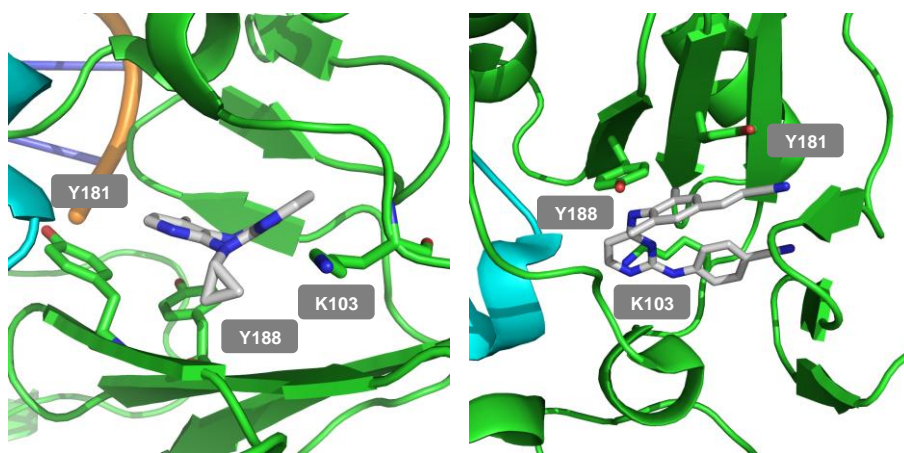


Figura 1.8 | Modo diferencial de unión de los IENNs (gris) de primera generación (izquierda, nevirapina, **17**) y de segunda generación (derecha, rilpivirina, **21**) en el bolsillo alostérico de la TI del VIH-1 (verde y azul).

Como se ha mencionado anteriormente, hasta la fecha se han aprobado un gran número de inhibidores de la TI del VIH-1. Sin embargo, dichos inhibidores presentan numerosas limitaciones. Así, a la aparición de cepas resistentes bajo presión de los fármacos anteriores, se suman problemas de toxicidad mitocondrial (análogos de sustrato) y hepática (IENN)⁴⁶. Además, se han descrito reacciones de hipersensibilidad en pacientes a estos fármacos así como problemas de interacciones cruzadas entre fármacos cuando se emplean análogos de sustrato⁴⁷.

La aparición de efectos secundarios indeseables, así como de cepas de virus resistentes frente a todos los fármacos aprobados para el tratamiento de la infección por VIH, hace que el *armamentarium* actual del que disponemos no sea suficiente para controlar la replicación viral y luchar así contra la enfermedad y, por tanto, sea necesario el diseño de nuevos fármacos efectivos en la lucha contra la infección por VIH, y especialmente de compuestos activos frente a las cepas de virus resistentes, que actúen frente a nuevas dianas o mediante mecanismos de acción diferentes a los actualmente conocidos.

1.2. Antecedentes

1.2.1. La interfaz de dimerización de la TI como diana terapéutica

El hecho de que, como se ha comentado anteriormente en la introducción, la TI necesite para actuar constituirse en forma dimérica, brinda una oportunidad singularmente propicia para intentar su inhibición por una vía novedosa y notablemente diferente a las utilizadas hasta la fecha, esto es, inhibiendo su dimerización, o lo que es lo mismo, interfiriendo con alguna de las interacciones proteína-proteína que se dan entre las subunidades p66 y p51. Entre las posibles ventajas de este nuevo tipo de inhibidores se encontrarían una especificidad mayor que la encontrada para otro tipo de moléculas actualmente utilizadas y un menos riesgo de aparición o selección de cepas resistentes, puesto que mutaciones en la interfaz p66/p51 dificultarían por sí mismas el proceso de asociación y la actividad catalítica de la enzima. Hasta la fecha esta estrategia ha sido muy poco estudiada como veremos a continuación, y todavía no existen representantes eficaces de esta clase de fármacos.

Análisis estructurales de la interfaz de dimerización revelan que existen tres grandes áreas de contacto entre las subunidades p66 y p51 de la TI⁴⁸ (Figura 1.9).

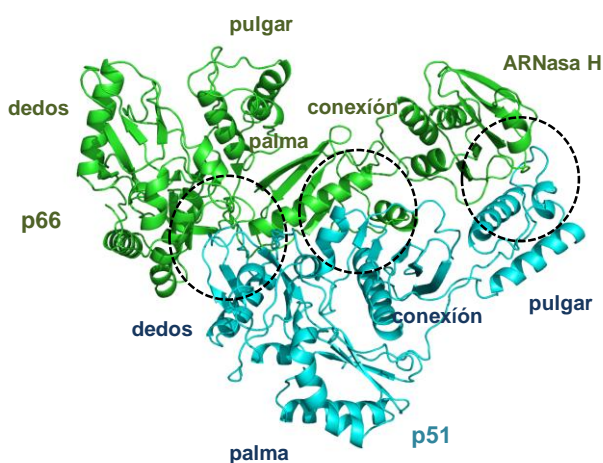


Figura 1.9 | Áreas de contacto entre las subunidades p66 y p51 de la TI.

La mayoría de estas superficies de interacción son hidrófobas⁴⁹. Los tres contactos abarcan gran parte de la interfaz de dimerización que incluye el contacto entre el subdominio dedos de la subunidad p51 con la palma p66. Los otros dos contactos se establecen entre los subdominios conexión de ambas subunidades y entre el subdominio pulgar de la p51 con el subdominio ARNasa H de la p66^{49a}. La zona más estudiada, un área de la interfaz rica en triptófanos en los subdominios de conexión de ambas subunidades, consta de seis residuos de triptófano en los codones 398, 401, 402, 406, 410 y 414. Estos residuos se encuentran altamente conservados en todas las transcriptasas de lentivirus de primates. Estudios de mutagénesis dirigida en dichos aminoácidos han demostrado que juegan un papel importante en la dimerización de la TI⁵⁰.

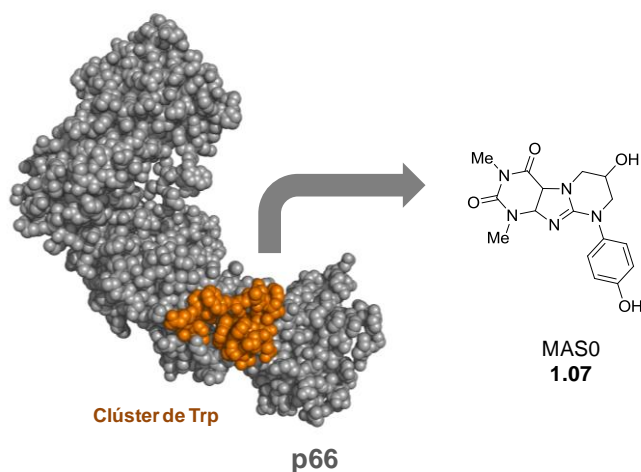
En 1994 el grupo de investigación dirigido por el Dr. Goody explora, por primera vez, el dominio de conexión de ambas subunidades como diana terapéutica (residuos 330 a 415) mediante el diseño de péptidos (de 10 a 19 aminoácidos) miméticos de este dominio de la interfaz entre las subunidades⁵¹ (Tabla 1.1). Entre todos ellos, el péptido **1.02** (19-*mer*), derivado del clúster de Trp mostraba una marcada inhibición en la constitución de heterodímero de la TI del VIH-1⁵¹ y VIH-2⁵². Posteriormente, Divita y colaboradores⁵³ optimizaron la secuencia mínima del péptido anterior, hallando que el decapeptido **1.05** (de secuencia KETWETWWTE) presentaba una marcada actividad anti-HIV en cultivo celular (rango nanomolar), bloqueando la replicación del virus cuando se combinaba con el transportador peptídico MPG⁵⁴. Además, este grupo ha demostrado mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) que el péptido **1.05** interacciona preferentemente con el dominio dedos de la subunidad p51, a través de los residuos Trp24 y Phe61⁵⁵, desestabilizando la conformación dimérica de la enzima dando lugar a la disociación de la misma.

Recientemente se han preparado otros péptidos, derivados del subdominio pulgar de la enzima (residuos 285-300), entre los cuales el péptido **1.06** (GTKWLTEWIPLTAEAEAC, 17-*mer*) se ha mostrado como inhibidor del proceso de maduración del heterodímero de la TI⁵⁶ (segundo paso) bloqueando a la enzima en una conformación catalíticamente inactiva.

Tabla 1.1 | Péptidos **1.01–1.05** derivados de los dominios de conexión de la interfaz p51/p66.

Péptido	Posición (residuos)	Secuencia
1.01	364-380	DVKQLTEAVQKITTESI
1.02	389-407	FKLPIQKETWETWWTEYWE
1.03	403-415	TEYWQATWIPEWE
1.04	330-345	QKQGQGQWTYQIYQEP
1.05	395-405	KETWETWWTE

En cuanto a moléculas no peptídicas, Restle y colaboradores han llevado a cabo recientemente un diseño de ligando basado en la estructura, mediante la generación de diversos modelos farmacofóricos a partir de los residuos clave del clúster de Trp del dominio conexión de la subunidad p66 (residuos 398-414)⁵⁷. Tras definir estos modelos, y llevar a cabo un cribado virtual, seleccionaron 10 moléculas candidatas, que fueron evaluadas *in vitro*. En estos estudios se identificó al compuesto MAS0 (**1.07**) (Figura 1.10) como un inhibidor moderado (rango micromolar) de las actividades polimerasa y RNasa H de la TI del VIH-1 y VIH-2.

**Figura 1.10** | Estructura de MAS0 (**1.09**), un inhibidor moderado de la TI del VIH-1 y VIH-2.

La familia de inhibidores alostéricos específicos de la TI de VIH-1, desarrollada por nuestro grupo, y cuyo prototipo es el derivado de timina denominado TSAO-T⁵⁸ (**1.08**) (Figura 1.11), constituyó el primer ejemplo de molécula pequeña no peptídica capaz de interferir la dimerización de la enzima, lo que resultaba en la pérdida de su capacidad de unión al ADN⁵⁹. Este grupo de derivados son inhibidores muy potentes a nivel nanomolar, y específicos de la replicación del VIH-1, pero muestran notables diferencias respecto a los otros IENNs en su comportamiento frente a la TI, lo que los convierte en una familia de compuestos singulares^{58e, 58f, 60}.

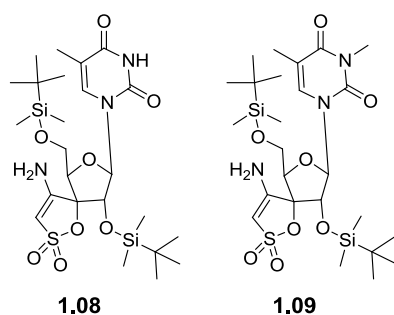


Figura 1.11 | Estructura de TSAO-T (**1.08**) y TSAO-m³T (**1.09**), inhibidores potentes de la TI del VIH-1.

Estudios de resistencia y mutagénesis dirigida mostraron que uno de los puntos de interacción clave de los derivados TSAO con la TI es el Glu138 del asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 de la enzima⁶¹, siendo éste el primer caso para el que se demostró la importancia de la subunidad p51 en la interacción enzima-inhibidor. En base a estudios computacionales⁶² realizados en colaboración con el equipo del Prof. Federico Gago de la Universidad de Alcalá, se propuso un modelo de interacción de los derivados TSAO con la enzima que difiere del modo *clásico* de unión de otros inhibidores específicos de VIH-1 no nucleosídicos (Figura 1.12). Según este modelo, TSAO-m³T (**1.09**) se situaría en la interfaz de las subunidades p66/p51, en la proximidad del bolsillo hidrófobo en la que se alojan los IENNs, e interaccionando con aminoácidos de ambas subunidades. TSAO-m³T se orientaría en la interfaz de tal manera que el elevado momento dipolar del anillo de

espiroaminooxatioldióxido se alinea adecuadamente en el campo creado por la región electrostática positiva de la Lys-101 y Lys103 de p66 y el Glu138 cargado negativamente de la subunidad p51. El grupo 4''-NH₂ del espiroanillo interacciona mediante un enlace de hidrógeno con el grupo carboxilo del Glu138 de p51. Este residuo determina la sensibilidad y la resistencia de la enzima a los efectos inhibitorios de los derivados TSAO.

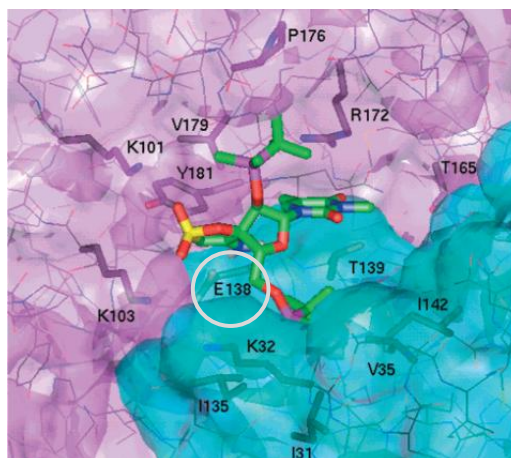


Figura 1.12 | Modelo de interacción de TSAO-m³T (1.09) con la TI del VIH-1.

Paralelamente a estos estudios, se llevó a cabo un estudio teórico sobre la contribución de cada residuo de ambas subunidades (p66/p51) de la TI del VIH-1 individual a la estabilidad de la interfaz de dimerización⁶². Como resultado se pudo identificar el asa formada por las láminas $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 (correspondiente al subdominio de los dedos de la subunidad p51) como una región *hot spot* para la dimerización de la enzima, región no explorada hasta el momento. Es precisamente en éste asa donde se localiza el Glu138, responsable de la resistencia a los derivados TSAO que se acaba de mencionar.

Recientemente, y en colaboración con el equipo del Prof. Edward Arnold (Rutgers University, EE UU), se ha conseguido co-cristalizar y resolver por difracción de rayos X la estructura cristalina de la molécula TSAO-m³T con la TI

del VIH-1⁶³. Según esta estructura, la molécula de TSAO- m^3T (**1.09**) se sitúa en el bolsillo hidrófobo donde se unen los IENNs pero presentando una conformación altamente distorsionada, *en forma de dragón*, donde interacciona con todos los residuos del bolsillo y provoca una expansión significativa de éste. Esta estructura cristalina permitiría considerar el modelo propuesto en el año 2001 como un bolsillo intermedio (*transient pocket*) en el proceso de entrada de TSAO al bolsillo donde interaccionan los IENN, proceso mediado por el asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51.

1.2.2. El asa $\beta 7/\beta 8$ como hot spot en la dimerización de la TI del VIH-1

El asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 es esencial para la constitución del heterodímero, y por tanto, para su actividad catalítica⁶⁴. Una parte del asa $\beta 7/\beta 8$ presenta una secuencia (SINNETPG) que es única para la TI del VIH-1 (Figura 1.13).

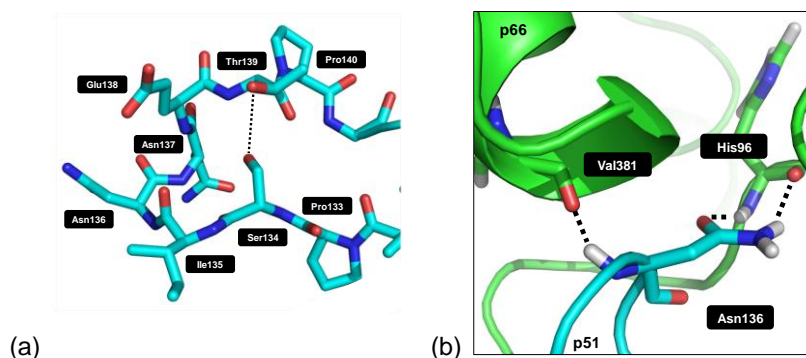


Figura 1.13 | (a) Estructura del asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 de la TI del VIH-1 (azul); (b) Detalle de las interacciones de la Asn136 de p51 con la subunidad p66 (verde).

Estudios exhaustivos de mutagénesis dirigida de los residuos 136-140 del heterodímero de la TI llevados a cabo por nuestros colaboradores⁶⁵ y otros grupos de investigación^{64, 66}, han demostrado que en la mayoría de estos mutantes, se observaba una pérdida casi total de la actividad ADN-polimerasa.

La delección de los residuos Ser134, Ile135 o Asn136 supone la pérdida de algo más del 50% de las actividades polimerasa y RNasa H de la TI del VIH-1^{66b}. La importancia de la Ser134 radicaría en su estabilización de la estructura del asa, debido a que la cadena lateral de la Ser134 establece un enlace de hidrógeno intramolecular con el oxígeno carbonílico de la Thr139. En el caso de la Ile135, su cadena lateral se encuentra enterrada en un bolsillo hidrófobo de la subunidad p66. Por último, el residuo altamente conservado de Asn136 parece ser particularmente importante para la estabilidad del heterodímero. Se ha observado que la mutación N136A supone la pérdida total de la actividad polimerasa y la degradación de la enzima por la proteasa del virión^{66c}. El carácter dual dador/aceptor en la formación de enlaces de hidrógeno de la cadena lateral de dicha asparragina, hace que establezca interacciones muy direccionales y altamente estabilizantes con los grupos CO y NH del esqueleto peptídico de la His96, así como, con el oxígeno carbonílico de la Val381 de la subunidad p66.

Todos estos estudios de mutagénesis dirigida junto con los resultados obtenidos con los derivados TSAO que interaccionan en esta zona de la interfaz e interfieren la dimerización, nos llevaron a proponer el asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 de la TI como *hot spot* para la búsqueda de inhibidores de la dimerización de la enzima.

1.2.3. Péptidos minimalistas derivados del asa $\beta 7/\beta 8$

Como estrategia de búsqueda de inhibidores de la dimerización de la TI, en nuestro grupo de investigación se seleccionaron péptidos *minimalistas* derivados de la secuencia del asa $\beta 7/\beta 8$ de p51 utilizando técnicas de modelado molecular⁶⁷ (Figura 1.14). En primer lugar, se escogieron el péptido lineal que contiene la secuencia entre las posiciones 132 y 142 (Ac-IPSIENNTPGI-NH₂) (**1.10**) del mencionado asa y el péptido cíclico de secuencia Ac-*ciclo*^{1,9}[CSIENNTPC]-NH₂ (**1.11**) portador de dos residuos de Cys, en sustitución de la Gly132 y la Pro140, que permiten la formación de un puente disulfuro, una de las estrategias más utilizadas para introducir restricciones conformacionales en péptidos.

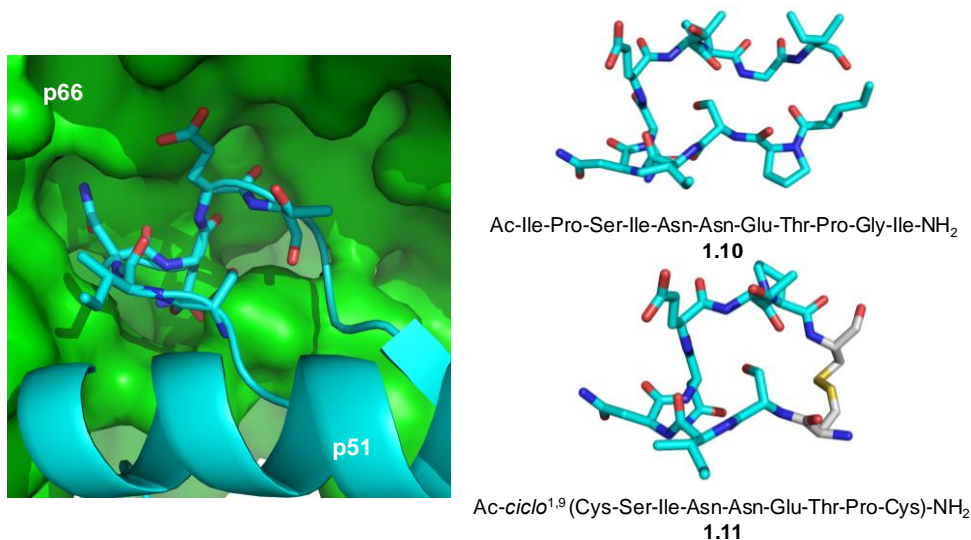


Figura 1.14 | Péptidos minimalistas **1.10** y **1.11** del asa $\beta 7/\beta 8$ diseñados por nuestro grupo.

Ensayos enzimáticos de dimerización realizados por el equipo del Prof. Jan Balzarini (Universidad de Lovaina, Bélgica) con ambos péptidos mostraron que el péptido cíclico **1.11** inhibía significativamente el proceso de dimerización de la enzima, aunque menos eficientemente que el péptido de referencia **1.05** rico en triptófanos (Ac-KETWETWWTE-NHCH₂CH₂SH). Sin embargo, el péptido lineal **1.10** no parecía tener ningún efecto en dicho proceso (Figura 1.15). En estos ensayos la enzima se disocia inicialmente con un 17% de acetonitrilo y luego se inicia la re-asociación de los monómeros diluyendo con disolución tamponadora (sin acetonitrilo) en ausencia y presencia de distintas concentraciones de los péptidos. La proporción de enzima heterodimérica activa se determina mediante un ensayo de actividad polimerasa.

Estudios conformacionales en disolución mediante técnicas de RMN en colaboración con la Dra. M.^a Ángeles Jiménez (Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC) indicaron que mientras el péptido lineal **1.10** no adopta ninguna estructura definida, observándose preferentemente conformaciones desplegadas, el péptido cíclico **1.11** mantiene un cierto grado de estructura similar

a la observada en el asa $\beta 7/\beta 8$ de la proteína nativa. Aún así, existían diferencias conformacionales significativas entre el péptido cíclico y el asa $\beta 7/\beta 8$, no observándose la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares que sí están presentes en el asa $\beta 7/\beta 8$ y contribuyen a estabilizar su estructura.

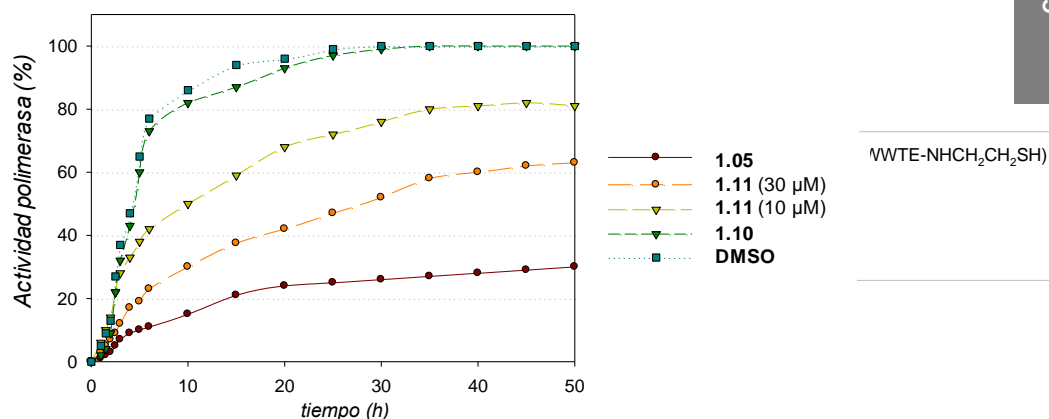
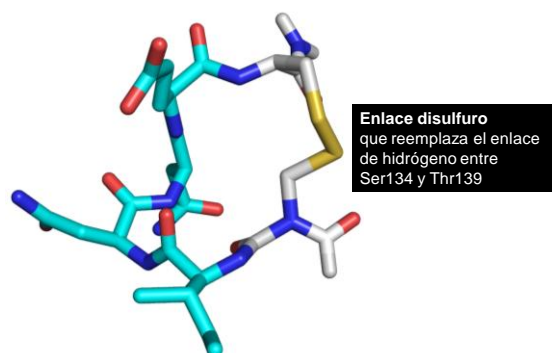


Figura 1.15 | Inhibición de la actividad polimerasa de la TI del VIH-1 en presencia de los péptidos **1.05**, **1.10** y **1.11**.

Dentro de una segunda generación de péptidos, con el fin de incrementar la restricción conformacional del péptido **1.11**, y conferir una mayor similitud estructural en la zona del giro con respecto a la del asa $\beta 7/\beta 8$, nuestro grupo se planteó la preparación y estudio estructural del hexapéptido cíclico **1.12** (Ac-ciclo^{1,6}[CINNEC]-NH₂) en el que se sustituyen los residuos de Ser134 y Thr139 (presentes en la proteína nativa) por dos cisteínas unidas a través de un enlace disulfuro reemplazándose así el enlace de hidrógeno observado en la enzima nativa por un enlace covalente (Figura 1.16). Los estudios conformacionales mediante técnicas de RMN indicaron que el péptido **1.12** adoptaba una conformación mejor definida alrededor de la secuencia IENNs y más similar a la del asa $\beta 7/\beta 8$ de la proteína nativa que el péptido cíclico **1.11** inicialmente diseñado.



Ac-ciclo^{1.6}(Cys-Ile-Asn-Asn-Glu-Cys)-NH₂
1.12

Figura 1.16 | Hexapéptido cíclico **1.12** en el que se reemplazan la Ser134 y la Thr139 presentes en el asa $\beta 7/\beta 8$ por dos cisteínas.

En colaboración con el equipo del Dr. Sluis-Cremer de la Universidad de Pittsburg (EE UU), que había puesto a punto un ensayo de dimerización de la TI del VIH-1⁶⁸, se ensayaron los péptidos **1.10–1.12**. Mientras que el péptido lineal **1.10** no mostraba inhibición significativa, el péptido cíclico **1.11** presentaba un valor IC₅₀ de 61±18 μ M. Coincidiendo con nuestra hipótesis de mayor restricción conformacional, el péptido **1.12** presentaba un valor de inhibición de la dimerización dos veces superior (IC₅₀ = 37±14 μ M). Estos resultados constituyen un punto de partida alentador y nos hacen considerar el hexapéptido cíclico **1.12** como un buen prototipo en la búsqueda de inhibidores de la dimerización de la TI del VIH-1.

1.3. Objetivos

El presente capítulo de esta memoria se engloba dentro de una novedosa línea de investigación iniciada en nuestro grupo, encaminada a validar el proceso de dimerización de la TI de VIH-1 como nuevo mecanismo alternativo de inhibición de la enzima, mecanismo muy poco estudiado hasta el momento, que podría dar lugar a nuevas familias de inhibidores potentes, selectivos y quizás menos proclives al desarrollo de resistencias.

En concreto los objetivos planteados en este trabajo son:

1. **Diseño y síntesis** de hexapéptidos cíclicos, análogos del prototipo **1.12** (Figura 1.17), previamente descrito en nuestro grupo, en los que se ha sustituido el puente disulfuro por otros tipos de enlaces covalentes habitualmente utilizados para restringir la conformación en péptidos. Con ello se pretende estudiar la influencia de esta modificación tanto en la actividad biológica como en la estructuración del péptido. Asimismo, los nuevos péptidos cíclicos diseñados presentarían una mayor bioestabilidad frente a reductasas que el prototipo **1.12**, lo que podría conducir a una mejora en sus propiedades farmacocinéticas.

Así, nos planteamos la preparación de una primera serie de péptidos cíclicos portadores de puentes hidrocarbonados (serie 1, **1.13-1.17**), uno de los cierres covalentes más inertes y estables químicamente en el organismo. Para ello, en primer lugar se propone sustituir los residuos de Cys del péptido prototipo **1.12** por residuos de alilglicina (Gly(alil)) para posteriormente generar el enlace covalente por reacción de metátesis a través de las cadenas laterales. Igualmente nos planteamos la síntesis de los péptidos **1.14** y **1.15** (serie 1), péptidos homólogos de los anteriores, que incorporan un metileno más en el cierre covalente. En este caso se sustituye una de las dos Cys del péptido prototipo **1.12** por un residuo de homoalilglicina (Hag).

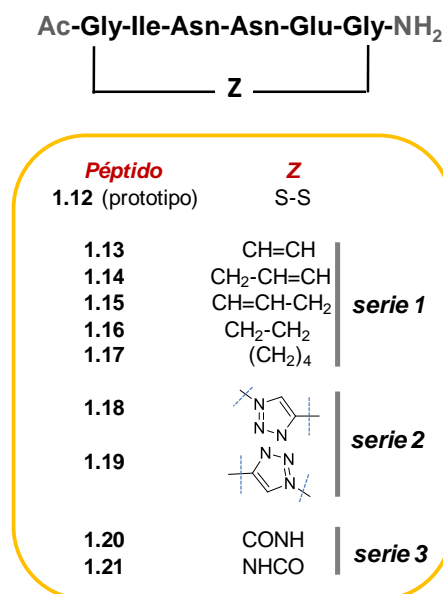


Figura 1.17 | Péptido prototipo **1.12** y estructura de los péptidos propuestos **1.13–1.21**.

Además, decidimos preparar los correspondientes productos de hidrogenación **1.16** y **1.17** del doble enlace con el fin de explorar un mayor espacio conformacional. Asimismo, nos planteamos una segunda serie de derivados, los péptidos **1.18** y **1.19**, donde se introduciría un anillo de 1,2,3-triazol 1,4-disustituido como cierre covalente, sintéticamente accesible mediante reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por especies de Cu. Por último, y con fines comparativos, nos proponemos acceder a los péptidos cíclicos **1.20** y **1.21** (serie 3) en los que la ciclación se lleva a cabo mediante un enlace amida. Cabe resaltar que los péptidos portadores de puentes 1,2,3-triazol o de un enlace amida tendrían la capacidad de formar enlaces de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo adicionales, que podrían influir tanto en la estructuración del péptido como en su potencial actividad biológica. En todos los casos los péptidos se sintetizarán acetilados en el extremo N-terminal y como carboxamidas C-terminales con el fin de aumentar la estabilidad hacia proteasas.

2. **Caracterización y estudio estructural** de los péptidos cíclicos sintetizados para evaluar la influencia de la naturaleza del cierre covalente sobre la estructuración de éstos y su comparación con el péptido prototipo **1.12** y con el asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 en la proteína nativa. Para ello, se llevará a cabo un análisis conformacional mediante técnicas experimentales de RMN en disolución.
3. **Evaluación *in vitro*** de los péptidos sintetizados como inhibidores de la actividad polimerasa de la TI del VIH-1 y como inhibidores del proceso de dimerización de la enzima.

1.4. Síntesis

1.4.1. Estrategia sintética general

La síntesis de los péptidos cíclicos objetivo se realizó en fase sólida (SPPS, del inglés *Solid Phase Peptide Synthesis*) siguiendo una estrategia Fmoc/tBu⁶⁹. La estrategia sintética general consta de las siguientes etapas (Figura 1.18): (1) síntesis manual en fase sólida de los péptidos lineales precursores (elongación), (2) ciclación, (3) acetilación del extremo N-terminal, y (4) desanclaje del soporte polimérico para obtener los péptidos objetivo.

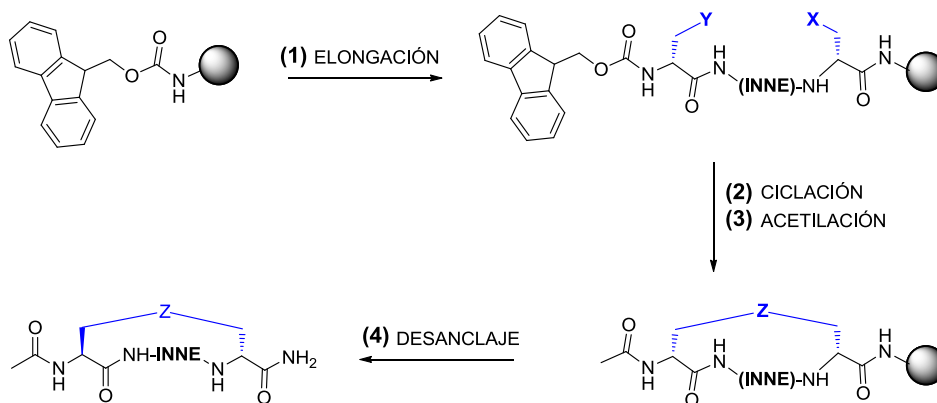


Figura 1.18 | Estrategia general de síntesis de los péptidos objetivo en fase sólida.

La síntesis de los péptidos lineales precursores consiste en la unión del aminoácido del extremo C-terminal a un soporte polimérico insoluble (resina) y la posterior elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido, de la cadena peptídica hacia el extremo N-terminal. Como estrategia de protección ortogonal se escogió la Fmoc/tBu⁶⁹, en la que se emplea el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo⁷⁰ (Fmoc) como grupo protector temporal del α -amino y grupos tipo *terc*-butilo (tBu) para la protección de las cadenas laterales. El grupo protector temporal (Fmoc) se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido en medio básico (por ejemplo, con un 20% piperidina/DMF en volumen). Una vez que el grupo α -amino se

encuentra libre, se une el aminoácido siguiente, previa activación de su grupo α -carboxilo. Este proceso se repite hasta completar la secuencia peptídica deseada.

Como soporte sólido se eligió una resina poliestirénica de tipo 4-metilbencidrilamina (MBHA) con un espaciador de tipo amida *Rink*⁷¹ de baja carga (0.47 mmol/g) con el fin de evitar posibles reacciones intermoleculares no deseadas en la etapa de ciclación y problemas de agregación de los péptidos (Figura 1.19). Tras tratamiento con una mezcla acidolítica de TFA, los péptidos se escindieron de la resina con el extremo C-terminal en forma de amida.

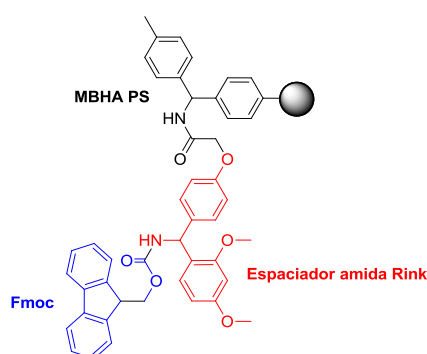


Figura 1.19 | Estructura de la resina MBHA con espaciador amida *Rink* protegida en forma Fmoc.

Como agentes de acoplamiento se emplearon dos tipos de reactivos (Figura 1.20). Por un lado, se utilizó *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) en presencia de 1-hidroxibenzotriazol⁷² (HOBt) como aditivo. El empleo de HOBt acelera la reacción generando un éster activado intermedio y reduce el riesgo de racemización en el $C_{\alpha}H$ aminoacídico. Por otro lado, se hizo uso del hexafluorofosfato de (2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio (HCTU) con diisopropiletilendiamina (DIEA) como base. Se ha observado recientemente que el uso del agente de acoplamiento HCTU reduce drásticamente los tiempos de reacción de acoplamiento en fase sólida⁷³.

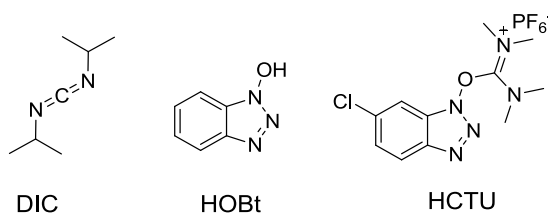


Figura 1.20 | Agentes de acoplamiento y aditivos empleados en la elongación de los péptidos.

El seguimiento de las reacciones de acoplamiento fue monitorizado con un ensayo colorimétrico cualitativo de ninhidrina para la detección de aminas primarias libres (o de Kaiser⁷⁴) así como mediante desanclaje de una pequeña muestra de peptidil-resina y análisis en HPLC acoplado a un detector de masas (HPLC-MS). El soporte polimérico está definido por el número de mmol de grupos reactivos por gramo de resina (carga de la resina). Sin embargo, al llevar a cabo el anclaje del primer residuo en la resina, y debido al carácter heterogéneo del medio de reacción, es posible que no reaccionen todas las posiciones de los grupos de anclaje del soporte polimérico, teniendo en este caso una menor carga (mmol/g) que la inicial. Ha sido por tanto necesario determinar siempre en el primer paso de anclaje la carga experimental de la resina. Para estimar la carga experimental de la resina se ha empleado el método descrito por Chan y White⁷⁵ basado en la determinación rápida y cuantitativa de Fmoc en disolución. Como por cada mmol de posición reactiva se tendría un mmol de Fmoc-aminoácido, la densidad de grupos reactivos por gramo sería directamente proporcional a la densidad de grupos Fmoc (Figura 1.21).

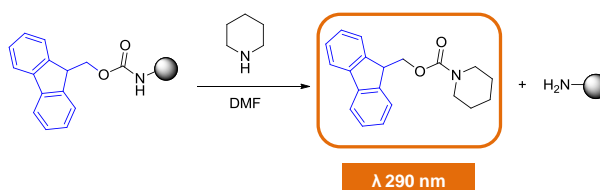


Figura 1.21 | Determinación espectrofotométrica a 290 nm del aducto piperidina-fulveno.

1.4.2. Serie 1. Péptidos cíclicos con puentes hidrocarbonados (1.13-1.17)

En primer lugar abordamos la síntesis de los péptidos cíclicos con puentes CH=CH (**1.13-1.15**) mediante reacción de metátesis cruzada de olefinas a través de las cadenas laterales de aminoácidos portadores de grupos alqueno (Figura 1.22). Para ello se prepararon los correspondientes péptidos lineales precursores **1.22-1.24**, portadores en los extremos N- o C-terminales de los residuos de Gly(alil) u homoalilglicina (Hag), en este último caso, incorporándose un metileno más en el cierre covalente. Asimismo, nos planteamos el aislamiento y purificación de dichos péptidos lineales con el fin de utilizarlos como péptidos control en los estudios biológicos. Finalmente, se llevó a cabo la reducción de los péptidos cíclicos insaturados, para acceder a los derivados saturados **1.16** y **1.17**.

1.4.2.1. Síntesis de los precursores lineales (1.22-1.24)

La síntesis de los péptidos lineales precursores se realizó en fase sólida siguiendo una estrategia de protección ortogonal Fmoc/tBu utilizando una resina MBHA con espaciador amida Rink, como se ha mencionado anteriormente.

La síntesis del péptido lineal anclado a la resina **1.25** (Esquema 1.1), portador de dos residuos de Gly(alil) en los extremos comenzó con el hinchado de la resina, la eliminación del grupo Fmoc en presencia de un 20% de piperidina y el anclaje de Fmoc-Gly(alil)-OH como primer aminoácido (el C-terminal de la secuencia). A continuación, se fueron introduciendo, uno a uno y de manera secuencial, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH y Fmoc-Gly(alil)-OH. En todos los casos se utilizó DIC (4 eq.) como agente de acoplamiento, HOBt (4 eq.) como aditivo, disueltos en DMF anhidra a temperatura ambiente. El tiempo de la reacción de acoplamiento fue de 12 h. Las cadenas laterales de las Asn fueron protegidas en la forma de tritilcarbamoil-derivados (Trt) y la de Glu en forma de éster butílico (O^tBu).

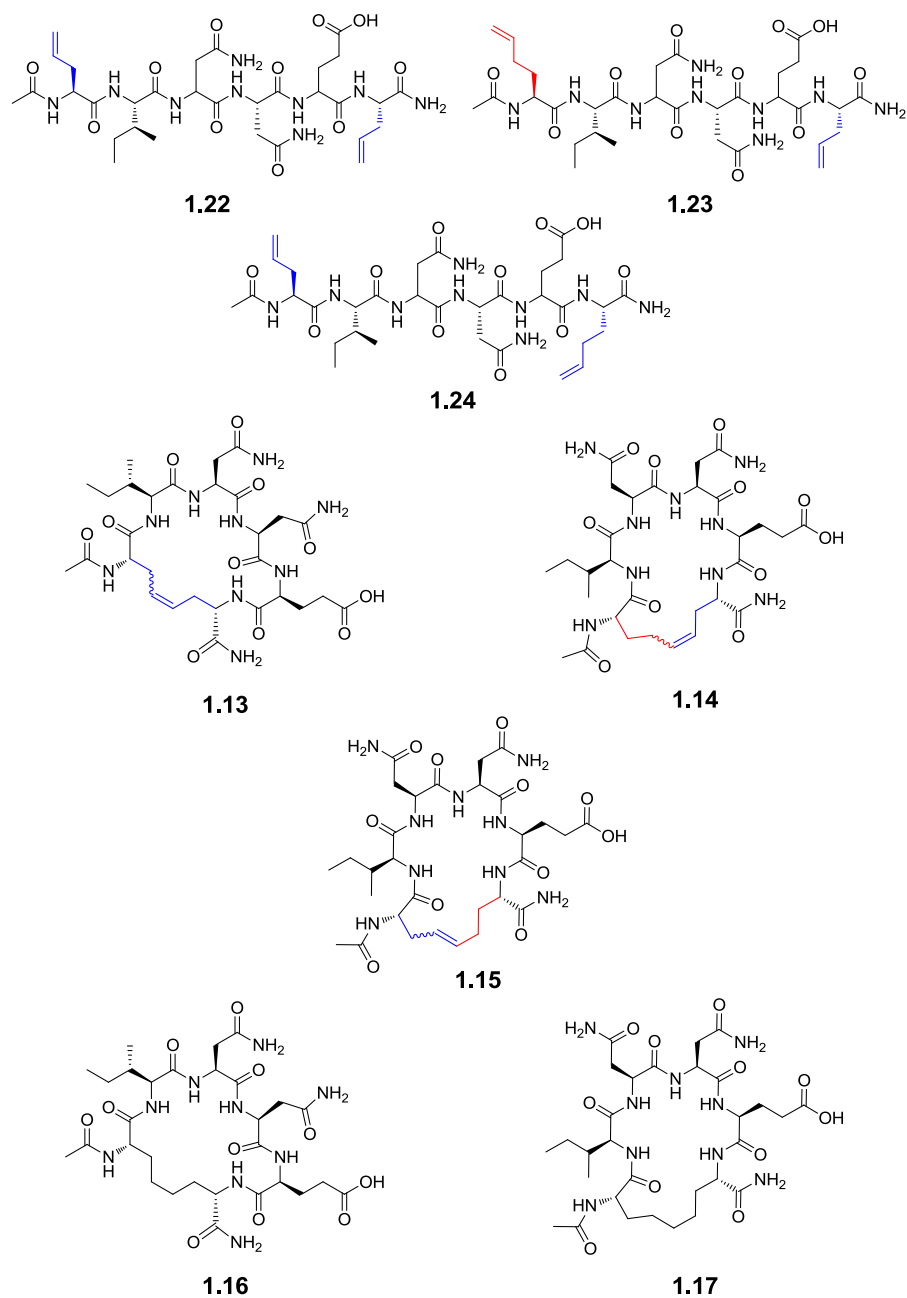
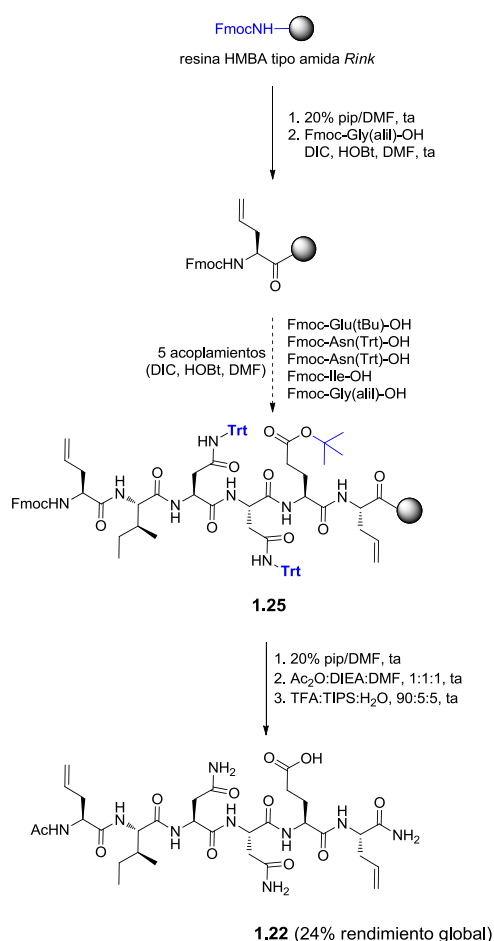


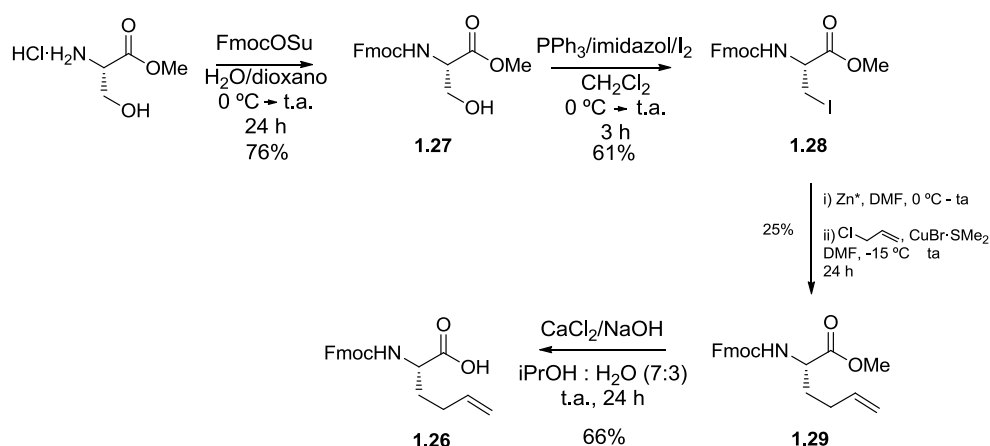
Figura 1.22 | Péptidos cíclicos 1.13-1.17 con puentes $\text{CH}=\text{CH}$ y $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ y sus análogos lineales 1.22-1.24. Se marcan en colores los residuos no naturales: Gly(alil) (azul) y Hag (rojo).

Una vez completada la elongación del péptido **1.25** y tras la eliminación del grupo Fmoc en condiciones estándar, se procedió a la protección del extremo N-terminal con un grupo acetilo por tratamiento con Ac_2O y DIEA en DMF a temperatura ambiente (Esquema 1.1). Finalmente, se llevó a cabo el desanclaje del péptido acetilado anclado a la resina usando una mezcla acidolítica de ácido trifluoroacético (TFA), trisisopropilsilano (TIPS) y agua. Tras sedimentación y liofilización del crudo, se purificó por cromatografía de fase reversa en un equipo de media presión (Biotage), obteniéndose el péptido **1.22** con un rendimiento global del 24% y una pureza en HPLC superior al 98%.



Esquema 1.1 | Síntesis del péptido lineal **1.22** acetilado en el extremo N-terminal.

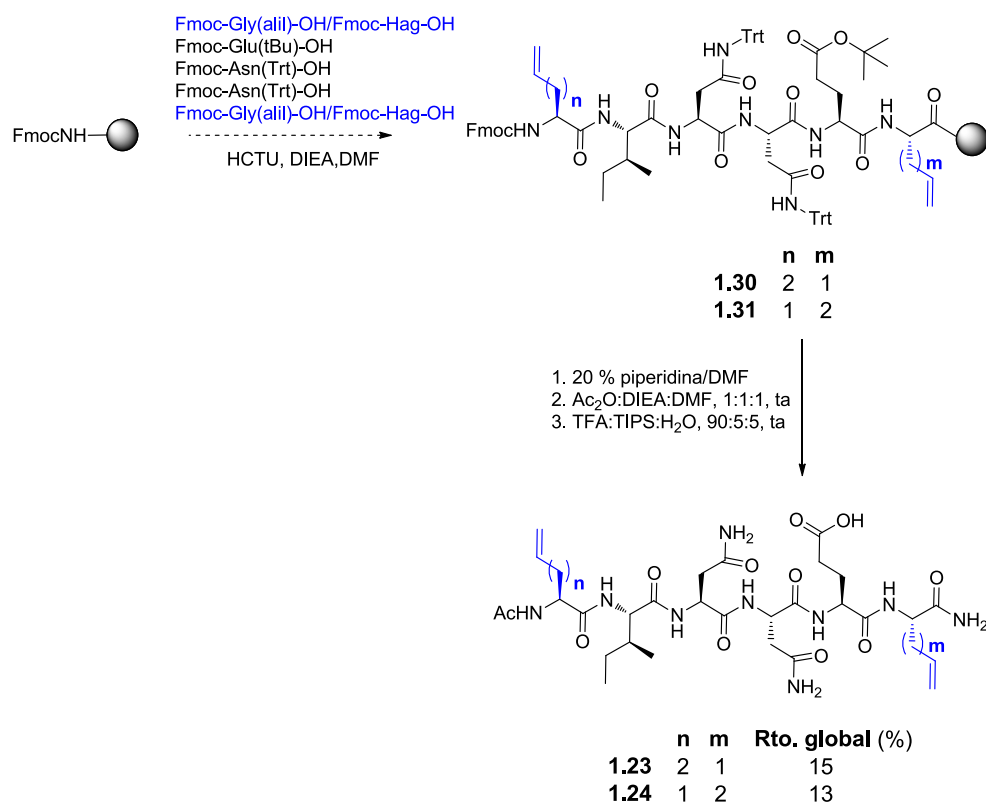
Para la síntesis de los péptidos **1.23** y **1.24** fue necesaria la preparación, en primer lugar, del aminoácido no proteínogénico Fmoc-Hag-OH (**1.26**). Éste se sintetizó en disolución a partir de H-Ser-OMe, en cuatro etapas, según la estrategia empleada por Lubell y colaboradores⁷⁶ (Esquema 1.2). Así, el tratamiento de H-Ser-OMe con FmocOSu en una mezcla de agua:dioxano 1:1⁷⁷, condujo a la Fmoc-Ser-OMe (**1.27**) con un rendimiento del 76%. A continuación, se accedió al iododerivado **1.28** con un rendimiento del 61% tras hacer reaccionar **1.27** con PPh₃/imidazol/I₂ en DCM seco a baja temperatura. Posteriormente, el tratamiento de **1.28** con Zn activado bajo atmósfera de Ar (formación de la especie organozíncica) seguido de reacción con CuBr·SMe₂ (transmetalación) y con cloruro de alilo (especie electrófila) condujo a **1.29** con un rendimiento del 25%⁷⁸. Por último, la saponificación del éster metílico **1.29** en medio básico usando CaCl₂/NaOH en iPrOH:H₂O (para preservar el grupo Fmoc⁷⁹) a temperatura ambiente permitió acceder a Fmoc-Hag-OH (**1.26**) con un rendimiento del 66%.



Esquema 1.2 | Síntesis de Fmoc-Hag-OH (**1.26**).

La síntesis de los péptidos lineales portadores de residuos de Hag **1.23** y **1.24** (Esquema 1.3), se llevó a cabo de forma análoga a la descrita para la síntesis del péptido **1.22**, pero usando en este caso HCTU y DIEA como agente de

acoplamiento, lo que nos permitió reducir el tiempo de la reacción de acoplamiento de 12 a 2 h. Tras el desanclaje de la resina, sedimentación y purificación por cromatografía de fase reversa en un equipo de media presión (Biotage), se obtuvieron los péptidos **1.23** y **1.24**, con unos rendimientos globales del 15 y 13%, respectivamente, y purezas superiores al 95% en HPLC en los dos casos.



Esquema 1.3 | Síntesis en fase sólida del péptidos lineales **1.23** y **1.24**.

1.4.2.2. Reacción de metátesis

Una vez preparados los péptidos precursores anclados a la resina, a continuación, se realizó la etapa de ciclación en fase sólida mediante reacción de metátesis de cierre de anillo⁸⁰ (RCM, *Ring Closing Metathesis*).

La reacción de metátesis cruzada de olefinas es una herramienta muy útil para la formación de un enlace nuevo C=C en presencia de catalizadores

organometálicos de tipo carbenoide⁸¹. Aunque la reacción de metátesis fue descrita hacia mitad de los años 50 del siglo pasado, el desarrollo posterior de los catalizadores de fórmula general $L_2X_2Ru=CHR$ ha supuesto un gran avance para la utilización de esta metodología en la síntesis de moléculas complejas por su mayor estabilidad, alta quimioselectividad y tolerancia a una gran variedad de grupos funcionales.

En los últimos años se han desarrollado diferentes catalizadores de Ru de tipo carbenoide que mejoran la reactividad de sus antecesores⁸². En concreto destacan los esfuerzos realizados por el grupo de investigación del Prof. Robert H. Grubbs (Premio Nobel 2005) en el desarrollo de los catalizadores homónimos de primera y segunda generación que se encuentran disponibles comercialmente⁸³ (**I** y **II**, Figura 1.23). En los catalizadores de segunda generación se ha reemplazado un ligando fosfina por un ligando carbeno *N*-heterocíclico saturado⁸⁴ que permite una mayor reactividad del catalizador (posee carácter de doble carbeno) así como una mayor estabilidad al aire. Destacan también los catalizadores de Hoveyda-Grubbs⁸⁵ (**III** y **IV**, Figura 1.23), desarrollados posteriormente, y que son empleados en reacciones que implican olefinas electrodeficientes y altamente impedidas.

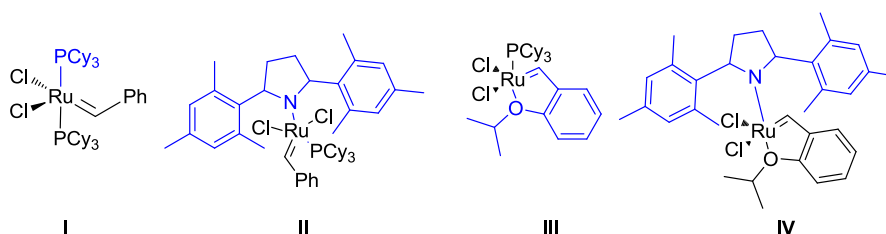
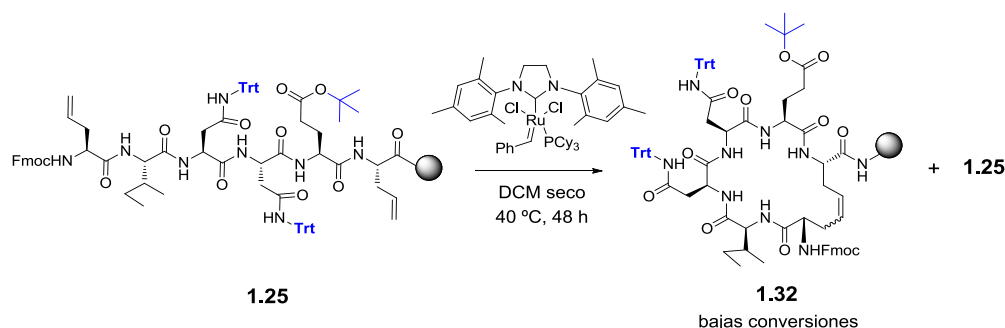


Figura 1.23 | Estructura química de los catalizadores de Grubbs de primera (**I**) y segunda generación (**II**) y catalizadores de Hoveyda-Grubbs de primera (**III**) y segunda (**IV**) generación.

Dentro de las distintas modalidades de reacciones de metátesis, la reacción de cierre de anillo^{80a, 86} (RCM) ha surgido como una poderosa herramienta en el campo de moléculas complejas como péptidos o peptidomiméticos⁸⁷. Hasta la fecha, en muchos de los ejemplos recogidos en la

bibliografía, las reacciones de RCM se habían llevado a cabo en disolución en presencia de los catalizadores de Grubbs de primera y segunda generación⁸⁸. Con el fin de evitar reacciones secundarias de entrecruzamiento, las reacciones se realizaban en condiciones de alta dilución utilizando bajas concentraciones de producto de partida. También, se han descrito ejemplos recientes de RCM en fase sólida donde se utilizan resinas de baja carga para evitar la formación de oligómeros. Sin embargo, el empleo de estos catalizadores heterogéneos en reacciones en fase sólida implicaría, a priori, tiempos de reacción mayores que en disolución. El grupo de Leatherbarrow describió por primera vez el uso de radiación de microondas para promover la reacción de RCM en un sustrato peptídico anclado a la resina⁸⁹, superando así las potenciales limitaciones que implicaba el uso de catalizadores heterogéneos en reacciones de SPPS.

En nuestro caso, en primer lugar nos planteamos la síntesis del derivado cíclico **1.32** a partir del péptido lineal precursor anclado a la resina **1.25** (Esquema 1.4) mediante reacción de RCM en fase sólida. Se decidió llevar a cabo la reacción sobre la peptidil-resina protegida en su forma Fmoc para una mejor visualización⁹⁰, eligiéndose el catalizador de segunda generación de Grubbs.

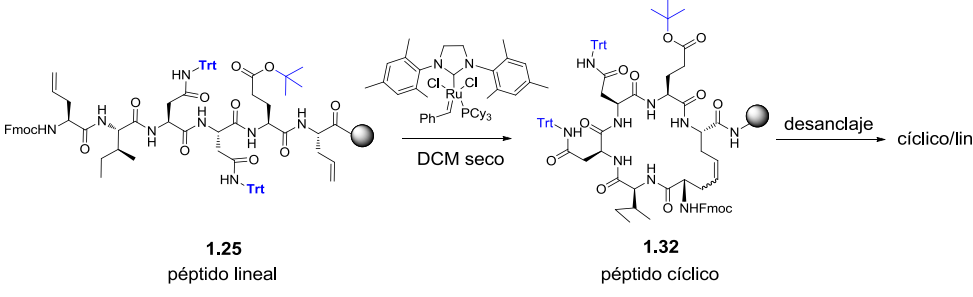


Esquema 1.4 | Primeros intentos de síntesis en fase sólida del péptido cíclico anclado a la resina **1.32**.

En los primeros ensayos la reacción se llevó a cabo en presencia de un 10% de catalizador en DCM anhidro a 40 °C. Al cabo de 48 h de reacción se observó tan sólo un 50% de conversión por HPLC tras el desanclaje de una

pequeña muestra de peptidil-resina. Con el fin de optimizar la reacción de metátesis se evaluaron distintas condiciones de reacción (Tabla 1.2) utilizando en todos los casos química asistida por microondas en base a los antecedentes bibliográficos comentados anteriormente.

Tabla 1.2 | Optimización de la reacción de RCM en fase sólida.



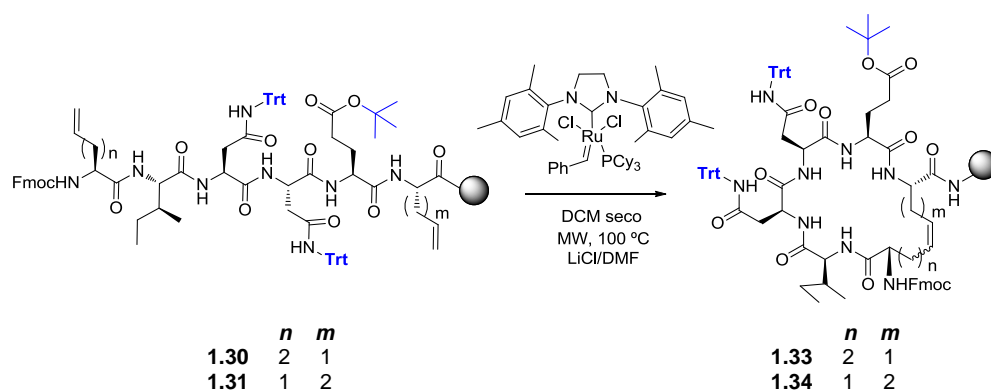
entrada	método	T (°C)	tiempo (h)	% catalizador	agente caotrópico	cíclico: lineal**
1	reflujo	40	48	10	-	50 : 50
2	microondas	100	1	10	-	93 : 7
3	microondas	100	1	10	LiCl/DMF	85 : 15
4	microondas	100	1	20	LiCl/DMF	96 : 4
5*	microondas	100	1	5-20	-	96 : 4
6*	microondas	100	1	5-20	LiCl/DMF	97 : 3

*En las entradas 5 y 6 se incrementó cada 15 min un 5% de catalizador hasta alcanzar el 20%. **Proporción de áreas determinada mediante HPLC-MS (254 nm) tras realizar el desanclaje de una pequeña cantidad de péptido anclado a la resina.

Cuando la reacción se llevó a cabo a 100 °C en presencia de un 10% de catalizador (*entrada 2*), la reacción mejoró considerablemente alcanzándose una conversión de más del 90% en tan sólo 1 h de reacción. Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de catalizador y la presencia o ausencia de LiCl como agente caotrópico para evitar la agregación del producto y facilitar el acceso de los reactivos⁹¹. El empleo de un agente caotrópico en el medio de reacción (10% en volumen de LiCl/DMF 0.4 M) no mejoró la proporción del producto de ciclación frente al lineal (*entrada 3*). Sin embargo, el empleo de un 20% de catalizador (*entradas 4-6*), añadido desde el principio, o poco a poco en intervalos de 15 min, en presencia o ausencia de LiCl, condujo a conversiones casi cuantitativas al producto cíclico deseado.

En los precedentes recogidos en la literatura y publicados por otros grupos⁹² se hacía ya mención de los mejores rendimientos y tiempos más cortos de reacción haciendo uso de microondas. Nuestros datos apoyan también estos resultados. Por tanto, escogimos como condiciones óptimas para la reacción de metátesis en nuestro caso el uso de microondas (100 °C, 1 h), un 20% de catalizador y presencia de LiCl/DMF como agente caotrópico (*entrada 4*).

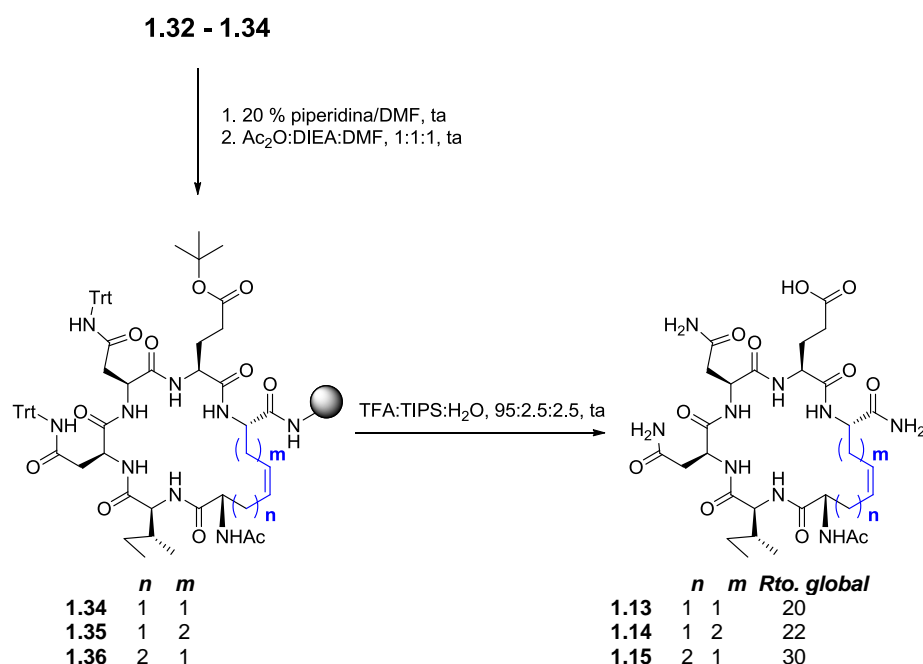
Una vez optimizadas las condiciones de metátesis, éstas se aplicaron a la ciclación de los péptidos lineales **1.30** y **1.31** portadores de residuos de Hag (Esquema 1.5), observándose también en estos casos por HPLC-MS conversiones cuantitativas a los correspondientes productos de ciclación. Cabe resaltar que estas condiciones de reacción fueron publicadas posteriormente por el grupo de Robert y colaboradores⁹³ para la síntesis en fase sólida de péptidos cíclicos.



Esquema 1.5 | Reacción de RCM a partir de los precursores lineales **1.30** y **1.31** en las condiciones óptimas.

En todos los casos, transcurrida la reacción de RCM, se llevó a cabo el lavado de la peptidil-resina para la eliminación de especies de Ru⁹⁴. De los distintos métodos descritos, en nuestro caso escogimos el tratamiento de las peptidil-resinas **1.32-1.34** con una mezcla de DMSO:DCM, 1:1 a temperatura ambiente durante 12 h⁹⁵. A continuación, se eliminó el grupo Fmoc del extremo N-

terminal y se acetiló en condiciones estándar ($\text{Ac}_2\text{O}:\text{DIEA}:\text{DMF}$) para dar lugar a las peptidil-resinas **1.35-1.37** (Esquema 1.6). El siguiente paso fue la escisión de los productos cíclicos de la resina mediante tratamiento acidolítico ($\text{TFA}:\text{TIPS}:\text{H}_2\text{O}$). Tras la sedimentación de los péptidos en Et_2O frío, liofilización del crudo y purificación cromatográfica en fase reversa en un equipo de media presión (Biotage), se obtuvieron los péptidos cíclicos objetivo **1.13-1.15** con rendimientos globales entre 20 y 30% y purezas superiores al 95% en HPLC.



Esquema 1.6 | Eliminación del grupo protector Fmoc, *N*-acetilación del extremo N-terminal y desanclaje de la resina para obtener los péptidos cíclicos objetivo **1.13-1.15**.

Los cromatogramas de HPLC analítico (214 nm) de los crudos de los péptidos **1.13-1.15** mostraron en cada caso dos picos, que se atribuyeron a la mezcla de isómeros *E/Z* en distintas proporciones en base a antecedentes bibliográficos^{95a} (Tabla 1.3). Sin embargo, la mezcla de isómeros *E/Z* no pudo separarse tras purificación cromatográfica. En la posterior asignación estructural por RMN no se pudo identificar de manera inequívoca la geometría del doble

enlace en cada uno de los isómeros en la mezcla E/Z debido la complejidad de los espectros de la mezcla.

Tabla 1.3 | Proporciones relativas de isómeros E/Z en los péptidos cíclicos **1.13-1.15***.

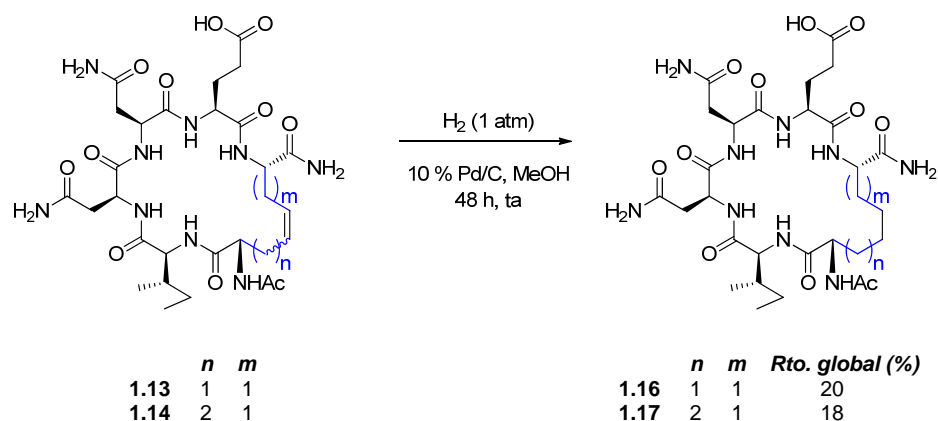
<i>Péptido cíclico</i>	<i>% isómeros E/Z**</i>
1.13	67:33
1.14	51:49
1.15	51:49

*Porcentaje calculado por integración de área de pico en HPLC a 214 nm. **No se ha podido identificar de forma inequívoca por RMN la geometría del doble enlace de cada uno de los isómeros.

Mientras que en el caso del péptido cíclico **1.13** se obtuvo una mayor proporción de uno de los isómeros, en los péptidos **1.14** y **1.15**, que presentan un metileno más en el cierre covalente, se obtuvieron mezclas ~1:1 de E/Z. Ello sugiere que en estos últimos casos, el aumento del tamaño de ciclo diluiría un posible efecto de restricción conformacional observado en la reacción de RCM para dar lugar a **1.13**. En la bibliografía se pueden encontrar ejemplos con resultados similares. Así, Vederas y colaboradores⁹⁵ describen cómo en el desarrollo de dicarba análogos de oxitocina, se obtiene una proporción 4:1 de isómeros Z/E cuando se lleva a cabo la de reacción de RCM entre dos residuos de Gly(alil). En cambio, cuando se introduce un metileno más en el cierre covalente (situación similar a nuestro caso), se reduce la diferencia entre uno y otro isómero, obteniéndose proporciones ~1:1.

1.4.2.3. Reacción de hidrogenación

Para la obtención de los análogos saturados **1.16** y **1.17** se llevó a cabo la reducción del doble enlace en disolución. Así, la hidrogenación catalítica de los crudos de los péptidos insaturados **1.13** y **1.14** (Esquema 1.7) en presencia de 10% de Pd/C como catalizador en MeOH, condujo tras purificación cromatográfica en fase reversa en un equipo de media presión (Biotage) a los péptidos saturados **1.16** y **1.17**, con rendimientos globales del 20 y 18%, respectivamente, y purezas superiores al 98% en HPLC.



Esquema 1.7 | Hidrogenación catalítica en disolución de los péptidos insaturados 1.13 y 1.14.

1.4.3. Serie 2. Péptidos cíclicos con puente de 1,2,3-triazol (1.18 y 1.19)

Como hemos mencionado anteriormente, nos planteamos una segunda serie de péptidos cíclicos con un puente 4,5-dimetilen-1,2,3-triazol 1,4-disustituído a partir de precursores lineales portadores de grupos azida y alquinos terminales 1.38 y 1.39 (Figura 1.24) mediante posterior reacción de cicloadición 1,3-dipolar.

Para la introducción de un grupo azida en péptidos, se han descrito dos estrategias: (1) diazotransferencia *in situ* sobre un grupo amino desprotegido de un péptido lineal precursor⁹⁶ y (2) introducción del aminoácido ya modificado como *building block* en la elongación modular del péptido lineal precursor. En nuestro caso, decidimos emplear la segunda estrategia. Así, se prepararon los péptidos lineales precursores anclados a la resina, portadores en los extremos *N*- y *C*-terminales de los aminoácidos no proteinogénicos Fmoc-*L*-proparglicina (Fmoc-Pra-OH) y Fmoc-Dap(N₃)-OH (1.40) en las dos posiciones, alternativamente.

1.4.3.1. Síntesis de los precursores lineales

En primer lugar, fue necesaria la preparación del aminoácido no proteinogénico de partida Fmoc-Dap(N₃)-OH (1.40) (Esquema 1.9).

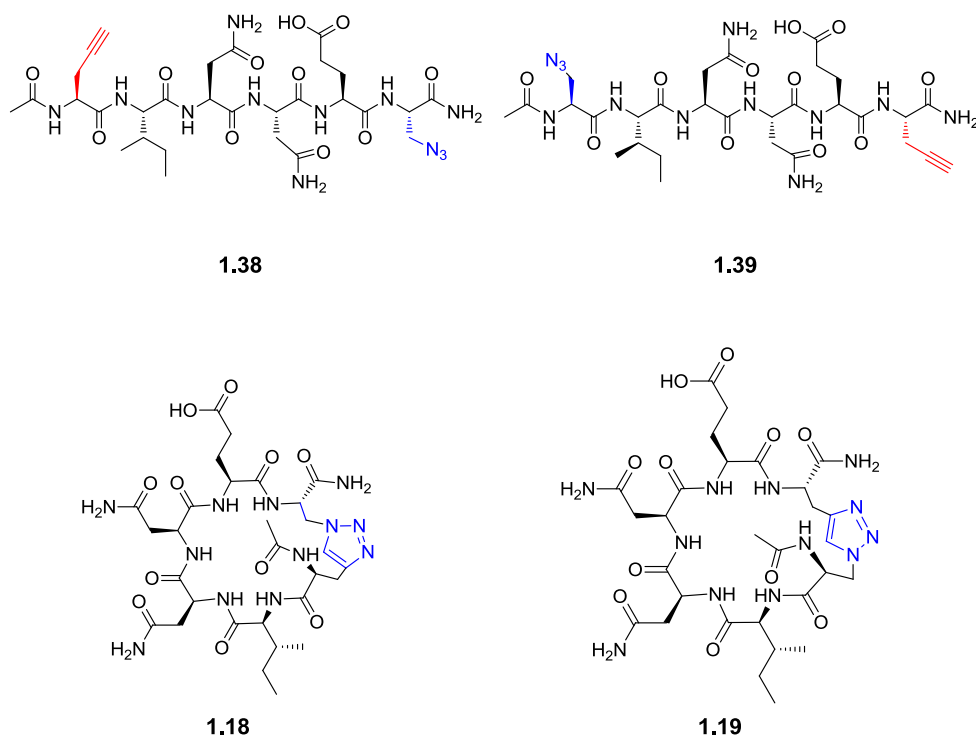
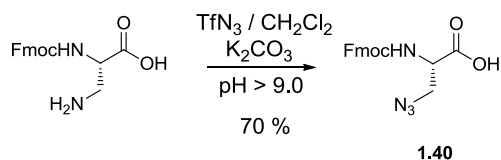


Figura 1.24 | Péptidos cíclicos **1.18** y **1.19** con un puente de 1,2,3-triazol y sus análogos lineales **1.38** y **1.39**. Se destacan en colores los residuos no naturales: Dap(N₃) (azul) y Pra (rojo).

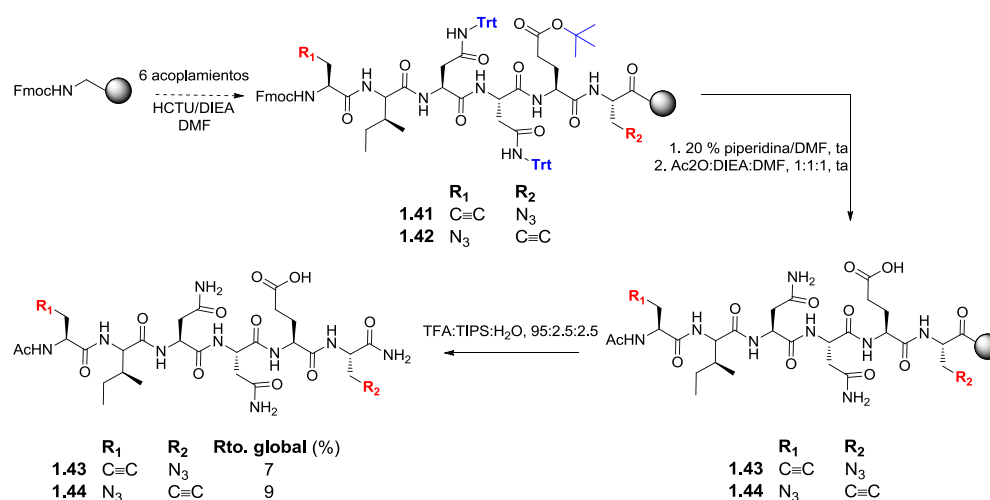
El tratamiento de Fmoc-Dap-OH con una disolución recién preparada de triflil azida (TfN₃) en DCM⁹⁷ en condiciones básicas, condujo al aminoácido deseado **1.40** con un 70% de rendimiento tras purificación cromatográfica⁹⁸.

Cuando se cambió el disolvente en la generación de la TfN₃ de DCM a tolueno, con el fin de evitar la posible formación de diazometano⁹⁹, se obtuvo **1.40** con un menor rendimiento (40%).



Esquema 1.9 | Síntesis del aminoácido no proteinogénico Fmoc-Dap(N₃)-OH (**1.40**) mediante reacción de diazotransferencia.

La síntesis de los péptidos lineales anclados a la resina **1.41** y **1.42** (Esquema 1.10) se realizó siguiendo el protocolo general descrito (apartado 4.2.3, Parte experimental) usando HCTU como agente de acoplamiento, DIEA como base y los aminoácidos protegidos convenientemente. Las reacciones de acoplamiento en estas condiciones se llevaron a cabo durante 1 h a temperatura ambiente. Las cadenas de los residuos de Asn y Glu se protegieron en la forma de tritilcarbamoil-derivados (Trt) y de éster butílico (O^tBu), respectivamente. Una vez terminada la elongación del péptido se llevó a cabo la desprotección del extremo N-terminal, posterior acetilación y el desanclaje del soporte polimérico en condiciones estándar (Esquema 1.10). Tras liofilización y purificación de los crudos de reacción por cromatografía de fase reversa en un equipo de media presión (Biotage), se obtuvieron los péptidos **1.38** y **1.39**, con unos rendimientos globales del 7 y 9%, respectivamente. En los dos casos las purezas fueron del 90% en HPLC.



Esquema 1.10 | Síntesis de los péptidos lineales **1.38** y **1.39**.

1.4.3.2. Reacción de cicloadición 1,3-dipolar alquino-azida

Para la obtención de los péptidos cíclicos objetivo **1.18** y **1.19**, se decidió llevar a cabo la reacción de cicloadición 1,3-dipolar en fase sólida a partir de los péptidos lineales anclados a la resina **1.41** y **1.42** protegido en el extremo N-terminal en forma de Fmoc.

La reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre una azida (dipolo) y un alquino terminal (dipolarófilo) fue descrita explícitamente en 1961 por Huisgen¹⁰⁰. La reacción precisaba de temperaturas elevadas así como largos tiempos de reacción. En estas condiciones, la reacción no era regioespecífica obteniéndose mezclas de 1,2,3-triazoles sustituidos en las posiciones 1,4 y 1,5 (Figura 1.25). En 2002, los grupos de Meldal¹⁰¹ y Sharpless¹⁰², de manera independiente, publicaron que esta reacción se aceleraba en presencia de catalizadores de Cu(I), y que además, a diferencia de la reacción clásica de Huisgen (activación térmica), la inserción inicial de la especie de Cu en el enlace C-H del alquino terminal conducía a la formación exclusiva del regioisómero 1,4-disustituido¹⁰³ (activación catalítica). Esta reacción, denominada CuACC¹⁰⁴ (del inglés *azide-alkyne click chemistry*) ha sido y sigue siendo la reacción prototipo de los llamados procesos *click chemistry* (término acuñado en 2002 por Sharpless y colaboradores¹⁰⁵). Su uso ha experimentado un crecimiento exponencial por parte de la comunidad científica en los últimos años¹⁰⁶.

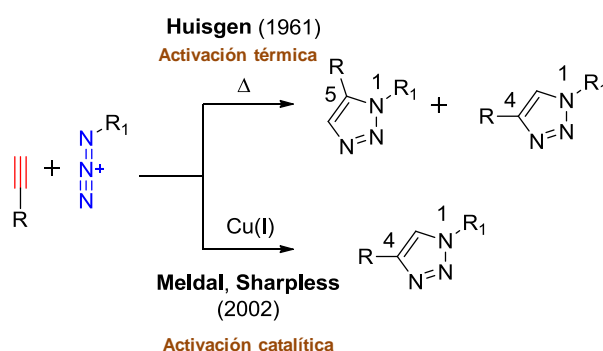


Figura 1.25 | Reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen¹⁰⁰ y su versión catalizada por Cu (I)¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ (CuACC).

Más recientemente se ha descrito el uso de complejos derivados de ciclopentadienilrutenio ($[\text{Cp}^*\text{RuCl}]$) para la obtención regioespecífica de 1,2,3-triazoles sustituidos en las posiciones 1,5¹⁰⁷ (denominada como RuACC). El fácil acceso de forma regioespecífica de 1,2,3-triazoles tanto 1,4 como 1,5-disustituidos, junto con la bioortogonalidad de la azida y el alquino, han hecho que estas reacciones se hayan usado ampliamente en el desarrollo de peptidomiméticos^{13, 108} o en otras áreas de la química bioorgánica, como por ejemplo en la introducción de marcadores en sistemas biológicos mediante bioconjugación¹⁰⁹. Destacan en el campo de los peptidomiméticos el uso de 1,2,3-triazoles como miméticos rígidos estables del enlace amida^{108c} (Figura 1.26); el 1,2,3-triazol 1,4-disustituido como isómero del enlace amida *trans*, y los 1,5-disustituidos como isómeros del enlace amida *cis*.

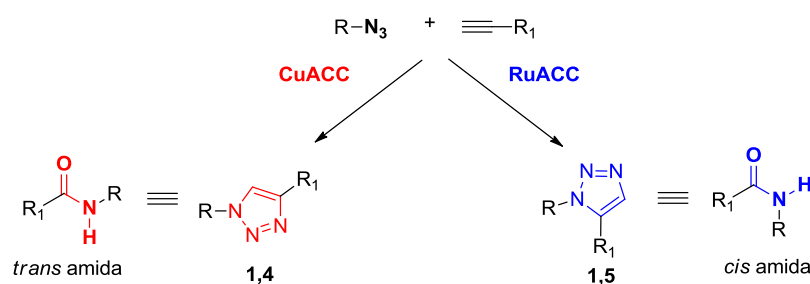
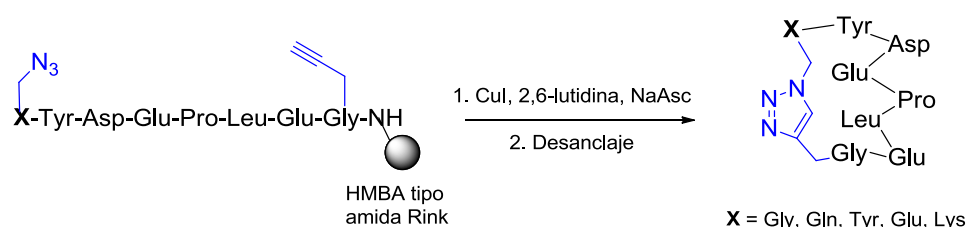


Figura 1.26 | 1,2,3-triazoles como isómeros del enlace amida.

Otro ejemplo más reciente ha sido el empleo de 1,2,3-triazoles como miméticos funcionales del enlace disulfuro¹¹⁰. Tanto los triazoles 1,4 como los 1,5 disustituidos presentan una geometría y distancias semejantes a las observadas en un enlace disulfuro. Por último, cabe destacar la utilidad de estos heterociclos como puentes covalentes en la estabilización de giros β ¹¹¹. En definitiva, las propiedades estructurales y electrónicas de los 1,2,3-triazoles y su mayor bioestabilidad cuando se compara con amidas o enlaces disulfuro, sitúan a estos heterociclos como estructuras privilegiadas en el campo de los peptidomiméticos.

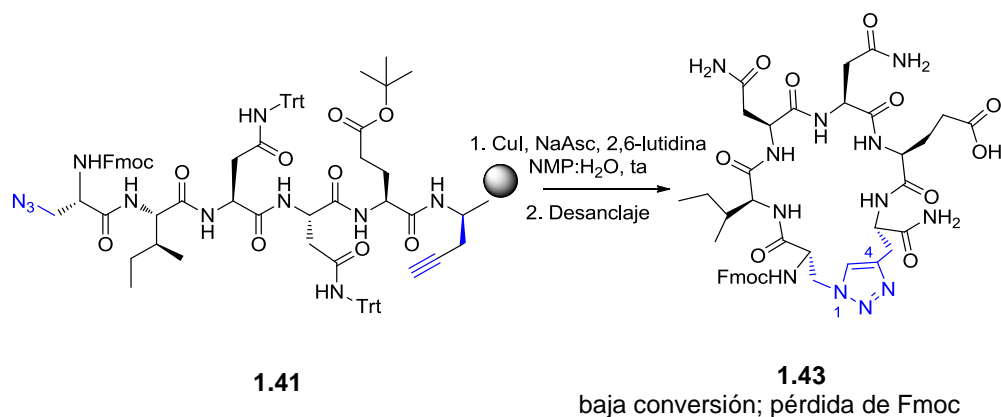
Las condiciones de cicloadición descritas en la bibliografía¹⁰³ son diversas, aunque todas ellas tienen en común el empleo de (i) una fuente de Cu(I), (ii) una base y (iii) un reductor de la especie de Cu para regenerar su estado de oxidación tras el ciclo catalítico^{104b}. Uno de los primeros antecedentes de CuACC para la síntesis de péptidos cíclicos en fase sólida fue descrito por Vidal y colaboradores¹¹², los cuales utilizaban la misma resina que en nuestro caso (MBHA tipo amida Rink), obteniendo exclusivamente el péptido cíclico producto de la ciclación intramolecular y superando los problemas de generación de productos secundarios de reacciones intermoleculares descritos previamente¹¹³ (Esquema 1.11).



Esquema 1.11 | Condiciones descritas por Vidal y colaboradores¹¹² para la síntesis de péptidos cíclicos ligandos del receptor EGF-1.

Así, para la preparación de los péptidos cíclicos objetivo (**1.18** y **1.19**), decidimos llevar a cabo la reacción de CuACC en fase sólida utilizando las condiciones descritas por Vidal y colaboradores¹¹². Con el fin de facilitar el seguimiento de la reacción por HPLC-MS (254 nm), decidimos utilizar como precursores de los correspondientes Fmoc derivados.

Así, el tratamiento de **1.41** con CuI, ascorbato sódico (NaAsc) y 2,6-lutidina¹¹² (Esquema 1.12) durante 96 h a temperatura ambiente, condujo, tras el desanclaje de una pequeña muestra y análisis por HPLC-MS, a bajas conversiones al producto de ciclación **1.43** respecto al péptido lineal (un 15% respecto al producto de partida).



Esquema 1.12 | Primeros intentos de ciclación mediante reacción de CuACC a partir del precursor en forma Fmoc **1.41**.

Además, se observó que el grupo Fmoc era parcialmente inestable a las condiciones de reacción, detectándose un pico correspondiente a dibenzofulveno (Figura 1.27).

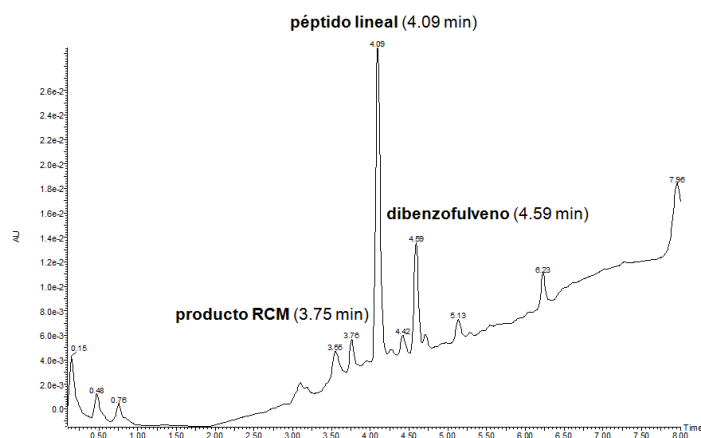


Figura 1.27 | Cromatograma de HPLC-MS del crudo de desanclaje del péptido **1.43** según las condiciones recogidas en el Esquema 1.12.

Se decidió entonces utilizar como producto de partida el precursor lineal acetilado en el extremo N-terminal (**1.44**) y llevar a cabo un estudio de

optimización de la reacción de CuACC en fase sólida. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 1.4.

En todos los casos se mantuvo como fuente de Cu(I) el Cul (da lugar a mayores velocidades de reacción)¹⁰³ y NaAsc como especie reductora para regenerar el sistema catalítico. Un factor importante en la reacción de cicloadición es la presencia de la base, ya que interviene en la abstracción del protón del alquino terminal. Así, decidimos evaluar distintas bases y disolventes siguiendo condiciones descritas en la bibliografía, así como, la influencia de la utilización de radiación de microondas respecto a la síntesis convencional.

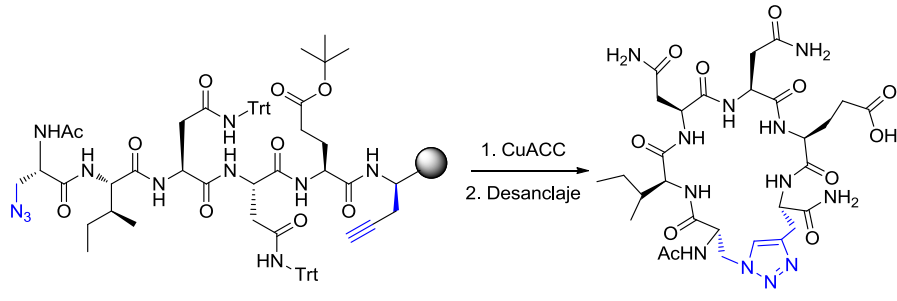
Como puede observarse en la Tabla 1.4, el tratamiento de **1.44** con Cul y NaAsc utilizando las condiciones descritas por Vidal y colaboradores¹¹² en la presencia de 2,4-lutidina como base ($pK_a = 6.6$) y NMP:H₂O, 4:1 como disolvente a temperatura ambiente durante 96 h condujo a la obtención del péptido cíclico deseado **1.18** con una conversión del 47% (*entrada 1*). Sin embargo, cuando se llevó a cabo la reacción en presencia de piperidina como base ($pK_a = 11.2$) y DMF como disolvente¹¹⁴ a temperatura ambiente durante 24 h no se detectó la formación del producto cíclico deseado (*entrada 2*). El empleo de microondas en la reacción fue decisivo para la optimización de la reacción de ciclación. El tratamiento de **1.44** en las condiciones de Vidal y colaboradores (*entrada 3*) a 100 °C utilizando calefacción por microondas durante 1 h, condujo a una reducción muy drástica del tiempo de reacción y conversiones del 50%.

Finalmente, cabe destacar que cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de piperidina como base y DMF como disolvente a 100 °C utilizando microondas durante 1h (*entrada 4*) se obtuvieron conversiones al producto de ciclación deseado. En ningún caso se observaron productos de dimerización o especies superiores (reacciones secundarias de entrecruzamiento)¹¹³.

Por tanto, las mejores condiciones de reacción en las que se observaron conversiones cuantitativas al péptido cíclico deseado fueron el empleo de Cul

(0.15 eq.), NaAsc (0.3 eq.) y piperidina al 20% en DMF como disolvente, a 100 °C durante 1 h usando calefacción por microondas.

Tabla 1.4 | Optimización de la reacción CuACC a partir del precursor acetilado **1.44***.



1.44
péptido lineal

1. CuACC
2. Desanclaje

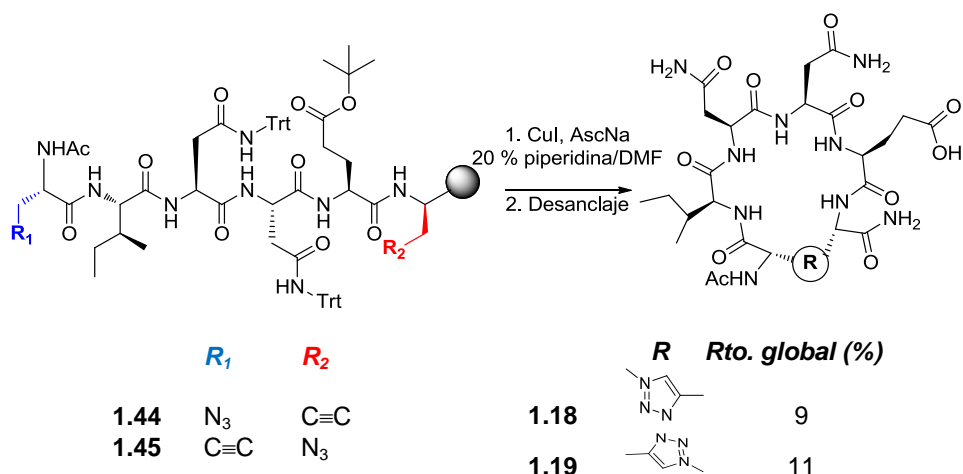
1.18
péptido cíclico

Entrada	Condiciones	Base	Disolvente	T	Tiempo (h)	cíclico:lineal
1	CuI (0.5 eq.), NaAsc (1.0 eq.)	2,6-lutidina	NMP:H ₂ O, 4:1	t.a.	96	47:53
2	CuI (0.15 eq.), NaAsc (0.3 eq.)	20% piperidina	DMF	t.a.	24	1:99
3	CuI (0.5 eq.), NaAsc (1.0 eq.)	2,6-lutidina	NMP:H ₂ O, 4:1	100 °C (MW)	1	50:50
4	CuI (0.15 eq.), NaAsc (0.3 eq.)	20% piperidina	DMF	100 °C (MW)	1	99:1

*Reacciones llevadas a cabo a una escala de 4-8 μ mol de **1.44**. **Medido integrando las áreas de picos en HPLC Analítico (Waters) con un gradiente A:B 5:95 a 30:70 en 30 minutos, donde A = H₂O 0.1% en TFA y B= CH₃CN. *t_R*: producto de partida (**1.44**), 14.44 min; producto cíclico (**1.18**), 9.37 min. La detección se ha realizado a 214 nm.

Una vez optimizada la reacción de CuACC se utilizaron estas condiciones para la obtención de los péptidos cíclicos objetivo **1.18** y **1.19** (Esquema 1.13) a partir de los precursores acetilados **1.44** y **1.45** a mayor escala. Tras el desanclaje y purificación de los crudos de reacción por mediante cromatografía de fase reversa en un equipo de media presión (Biotage), los péptidos **1.18** y **1.19** se

obtuvieron con unos rendimientos globales del 9 y 11% y purezas del 94% y 87%, respectivamente.



Esquema 1.13 | Síntesis de los péptidos objetivo **1.18** y **1.19**.

Cabe resaltar que en estos casos la monitorización de la reacción de CuACC se llevó a cabo de manera cualitativa por espectroscopía de infrarrojo (IR) determinándose la presencia/ausencia de la banda de tensión asimétrica de la azida (sobre 2100 cm^{-1}), banda fácilmente observable ya que se encuentra en una zona en la que no aparecen bandas correspondientes a grupos funcionales característicos de péptidos (Figura 1.28). Este tipo de monitorización es versátil y sencilla, utilizándose directamente una pequeña muestra de peptidil-resina lavada y seca en la preparación de la pastilla de KBr, sin necesidad de desanclaje lo que supone una clara ventaja operativa frente al seguimiento por HPLC-MS.

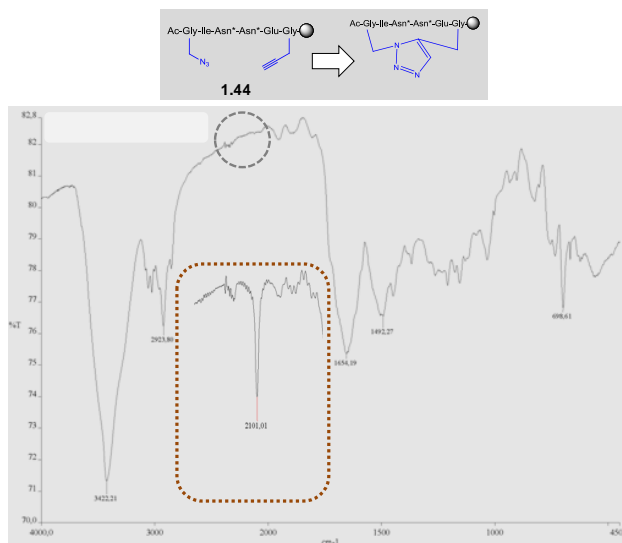


Figura 1.28 | Monitorización por IR de CuACC (derecha) en fase sólida. Se muestra el espectro de IR del derivado cíclico anclado a la resina y recuadrada la banda de azida en el espectro de IR del precursor lineal **1.44**.

1.4.4. Serie 3. Péptidos cíclicos con puente amida (1.20 y 1.21)

Finalmente y con fines comparativos, nos planteamos la sustitución del puente disulfuro del péptido prototipo **1.12** por un enlace amida, y así la preparación de las lactamas **1.20** y **1.21** (Figura 1.29).

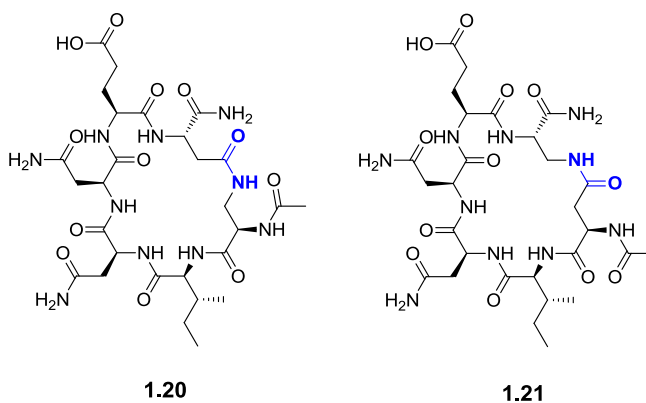


Figura 1.29 | Péptidos cíclicos **1.20** y **1.21**, portadores de un puente amida.

Para ello, se prepararon los péptidos lineales precursores, portadores de los aminoácidos Asp y Dap convenientemente protegidos como residuos N- y C-*terminales* de forma ortogonal en su forma de éster alílico (OAl) y carbamato de alilo (Alloc), respectivamente. De esta forma, las cadenas laterales de Asp y Dap podrían desprotegerse de forma previa al desanclaje, para posteriormente realizar la ciclación en fase sólida. Asimismo, se intercambiaron estos residuos de los extremos (N- y C-*terminales*) con el fin de estudiar la influencia de la orientación del puente amida (CONH ó NHCO) en la estructuración y actividad biológica.

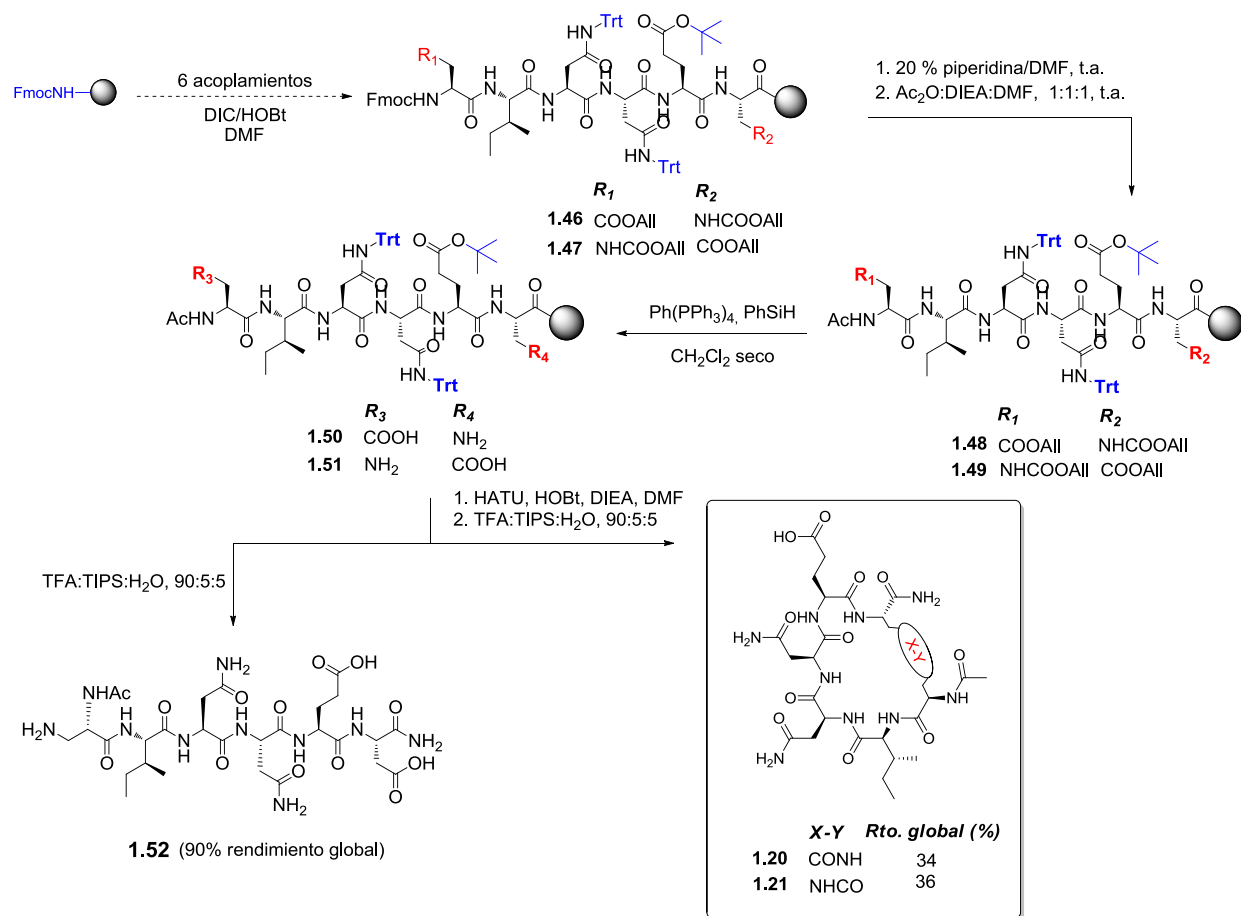
La síntesis de los precursores lineales anclados a la resina **1.46** y **1.47** con el extremo N-terminal protegido en forma de Fmoc (Esquema 1.15) se realizó mediante la metodología estándar de síntesis de péptidos en fase sólida mencionada anteriormente, utilizando DIC/HOBt como agente de acoplamiento (método A, Parte Experimental). Posteriormente, se llevó a cabo la eliminación del grupo protector Fmoc de los extremos N-terminales y la acetilación en condiciones estándar para dar lugar a las peptidil-resinas **1.48** y **1.49**.

Antes de la última etapa de ciclación intramolecular, fue necesaria la desprotección de las cadenas laterales de los residuos de Asp y Dap. La eliminación de los grupos Alloc y OAl implica una transferencia catalizada por Pd a diferentes nucleófilos o *scavengers* en presencia de una fuente prótica. En nuestro caso, y en base a condiciones recogidas en la bibliografía¹¹⁵, la desprotección de las cadenas laterales de las peptidil-resinas **1.48** y **1.49** se llevó a cabo en presencia de Pd(PPh₃)₄ como catalizador y PhSiH₃ como fuente dadora de hidrógeno, en DCM seco bajo atmósfera de Ar, para dar lugar a las peptidil-resinas **1.50** y **1.51** (Esquema 1.14).

Posteriormente, se procedió a aislar el péptido lineal **1.52**, como control en los ensayos biológicos. Así, tras el desanclaje de la peptidil resina de **1.50** con una mezcla acidolítica de TFA, y purificación del crudo de reacción por cromatográfica en fase reversa en un equipo de media presión (Biotage), se obtuvieron 58 mg (90% rendimiento global) del péptido **1.52** (Esquema 1.14), con una pureza superior al 98% en HPLC.

A continuación, se estudió la ciclación intramolecular en fase sólida para la obtención de los péptidos cíclicos objetivo. En base a precedentes bibliográficos¹¹⁶ se utilizaron como agentes de acoplamiento tanto una sal de fosfonio (PyAOP) como una sal de uronio (HATU). Los primeros intentos de ciclación de **1.49**, para obtener el péptido cíclico **1.53** (Esquema 1.14), en presencia de PyAOP como agente de acoplamiento (10 eq.), HOAt como aditivo (10 eq.) y DIEA (20 eq.) como base en DMF anhidra a temperatura ambiente durante toda la noche. El ensayo de Kaiser fue positivo, indicando que aún persistían aminas primarias libres, y por tanto, la reacción no se había completado. Sin embargo, cuando la reacción de ciclación se realizó en presencia de HATU (10 eq.) como agente de acoplamiento, junto con el auxiliar HOBt (10 eq.) y DIEA (20 eq.) como base, tras 12 h de reacción el ensayo de Kaiser resultó negativo, lo que indicaba que la ciclación se había completado.

Estas mismas condiciones se aplicaron para la síntesis del péptido cíclico **1.21** a partir de la peptidil-resina **1.51**. Por último, se llevó a cabo el desanclaje en condiciones acidolíticas estándar y la posterior purificación de los crudos de reacción mediante cromatografía de fase reversa en un equipo de media presión (Biotage) (**1.20**) y por HPLC semipreparativo (**1.21**), lo que permitió acceder a los péptidos objetivo **1.20** y **1.21** con rendimientos del 34 y 36%, respectivamente y elevadas purezas (>98%).



Esquema 1.16 | Síntesis del precursor lineal **1.52** y de los péptidos cíclicos **1.20** y **1.21**.

1.5. Estudio conformacional en disolución mediante técnicas de RMN

Seguidamente, decidimos llevar a cabo un análisis conformacional en disolución de los péptidos cíclicos objetivo **1.13-1.21** mediante técnicas de RMN, para evaluar la influencia de la naturaleza del cierre covalente sobre la estructuración de los péptidos cíclicos y su comparación con el péptido prototipo **1.12** y con el asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 en la proteína nativa. Estos estudios se realizaron en el Instituto de Química Física Rocasolano del CSIC en colaboración con la Dra. M.^a Ángeles Jiménez.

La actividad biológica de las distintas macromoléculas en los medios biológicos como son los ácidos nucleicos o las proteínas está estrechamente ligada a su estructura tridimensional. Existen diferentes técnicas experimentales y teóricas para la determinación estructural de macromoléculas. En concreto, la RMN junto con la difracción de rayos X son los métodos que permiten la determinación estructural de biomoléculas con resolución a nivel atómico¹¹⁷. Sin embargo, la ventaja fundamental de la RMN reside en que las medidas pueden realizarse en disolución¹¹⁸ (normalmente disolución acuosa), condiciones que son más similares al entorno acuoso de las biomoléculas en el interior de las células.

En la Figura 1.30 se indican los parámetros y las etapas que se han seguido para el estudio conformacional de los péptidos en disolución **1.13-1.21** mediante RMN. En primer lugar, fue necesaria la asignación previa de las señales en los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN. A continuación, se determinaron los desplazamientos conformacionales o desviaciones de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) y los coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$) de los protones amida, parámetros que se relacionan con el tipo de estructura secundaria que presentan los aminoácidos contenidos en los péptidos y con la potencial participación de los protones amida en enlaces de hidrógeno intramoleculares, respectivamente. Seguidamente, se midieron los NOEs/ROEs que presentan los péptidos objeto de estudio en disolución acuosa, parámetro de RMN fundamental para la determinación estructural. Los NOE/ROEs no secuenciales observados, junto con los intervalos de ángulos diedros como restricciones geométricas se utilizaron para

el cálculo de estructura usando el programa CYANA¹¹⁹. Por último, se superpusieron las mejores estructuras obtenidas con el asa $\beta 7/\beta 8$ de p51 así como con el péptido prototipo **1.12** con el fin de llevar a cabo un análisis estructural comparativo.

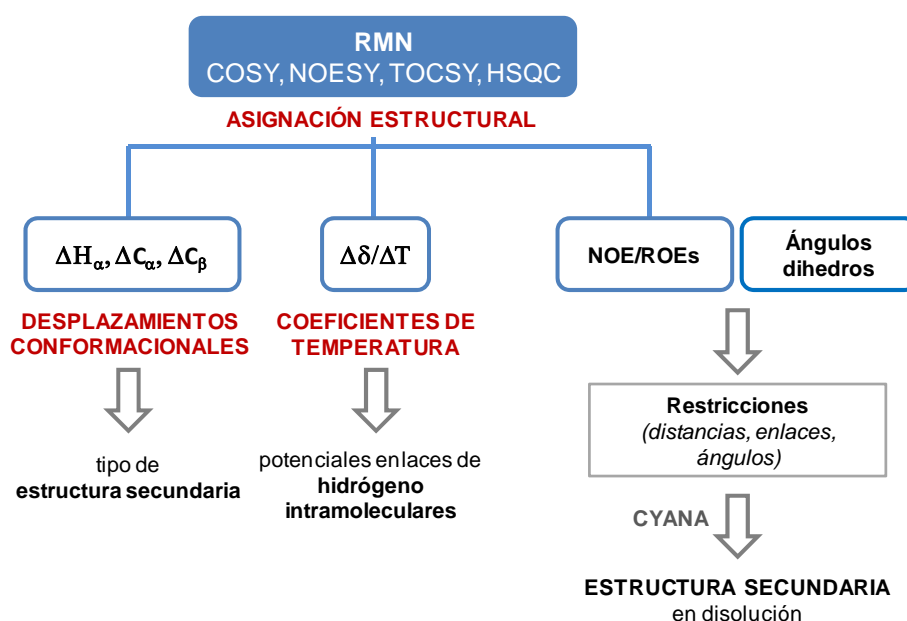


Figura 1.30 | Parámetros y etapas del estudio conformacional en disolución mediante RMN.

1.5.1. Asignación estructural

Para el análisis conformacional de los péptidos **1.13-1.21** se ha llevado a cabo la adquisición de todos los espectros de RMN en disolución usando una mezcla de H₂O:D₂O en proporciones volumétricas 9:1.

La asignación completa de los espectros de RMN se ha realizado en base a experimentos bidimensionales siguiendo el procedimiento estándar de asignación secuencial propuesta por Wüthrich y colaboradores¹²⁰. Primero se identificaron las distintas unidades o sistemas de espines (aminoácidos) mediante espectros bidimensionales homonucleares de ¹H-RMN basados en conectividades

escalares ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY), y posteriormente, a través de conectividades espaciales entre $(\text{C}_\alpha\text{H})_i$ y $(\text{CONH})_{i+1}$, se estableció la secuencia peptídica ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY/ROESY) (Figura 1.31).

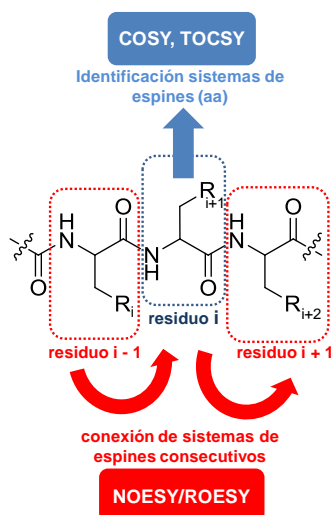


Figura 1.31 | Asignación sistemática de los espectros de RMN de un sustrato peptídico.

Los desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN se asignaron a partir de señales de conectividades geminales entre ^1H -RMN y ^{13}C -RMN observados en espectros de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC. En todos los casos se adquirieron los desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN hasta 65 ppm, quedando fuera de este rango, por ejemplo, los carbonos tipo $\text{C}=\text{X}$ contenidos en varios de los cierres covalentes. Por último, los protones amida fueron asignados inequívocamente mediante la adquisición de espectros bidimensionales heteronucleares $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ tipo HSQC.

Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de los péptidos **1.13-1.21** se encuentran recogidos en las Tablas PE3-PE13 de la Parte Experimental. Cabe destacar, que los péptidos **1.13-1.15** (serie 1), portadores de puentes $\text{CH}=\text{CH}$, se aislaron como mezclas de isómeros E/Z en distinta proporción, y se identificaron los grupos de señales correspondientes a cada uno de los isómeros, pero no pudo

asignarse de forma inequívoca la geometría del doble enlace debido a la complejidad de los espectros monodimensionales de ^1H -RMN (5-6 ppm) en la zona de las señales olefinicas.

1.5.2. Desplazamientos conformacionales ($\Delta\delta$)

En el caso de péptidos y proteínas, el desplazamiento químico puede aportar información valiosa acerca de la estructura secundaria. Este hecho se debe a la dependencia del desplazamiento químico (δ) de los núcleos ^1H , $^{13}\text{C}\alpha$ y $^{13}\text{C}\beta$ de los aminoácidos con los ángulos dihedros ϕ , ψ y ω (Figura 1.32).

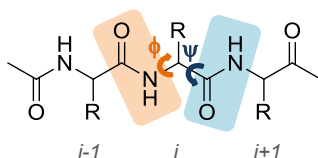


Figura 1.32 | Para un residuo i , el ángulo ϕ está definido por los átomos $\text{C}_{i-1}\text{-N-C}\alpha\text{-C}$; y el ángulo ψ , definido por los átomos $\text{N-C}\alpha\text{-C-N}_{i+1}$. Todos ellos presentan valores comprendidos entre -180° y 180° .

Para un núcleo i en un péptido dado, se define su **desplazamiento conformacional** o **desviación del desplazamiento químico** ($\Delta\delta_i$) como la diferencia entre el valor de su desplazamiento químico experimental observado y el valor empírico tabulado para ese núcleo i cuando se encuentra en un péptido sin estructura definida (*random coil*), en un disolvente y a una temperatura dados. El valor se calcula con la siguiente fórmula:

$$\Delta\delta_i = \Delta\delta_i^{\text{exp}} - \Delta\delta_i^{\text{random coil}}, \text{ ppm}$$

donde i puede ser $^1\text{H}\alpha$, $^{13}\text{C}\alpha$ o $^{13}\text{C}\beta$.

Los valores de $\Delta\delta$ permiten estimar si el péptido o proteína se encuentra plegado en forma de hélice α , lámina β o como estructura desordenada. Los residuos localizados en giros o hélices α suelen presentar valores de $\Delta\delta\text{C}\alpha\text{H}$ negativos o muy próximos a cero y valores de $\Delta\delta\text{C}\beta\text{H}$ de signo distinto

dependiendo del giro. Los residuos presentes en hojas β tienen signos opuestos a los de los giros o hélices α . En todos los casos se consideran valores significativos cuando los desplazamientos conformacionales son mayores de 0.1 ppm en valor absoluto.

En nuestro caso se tomaron como valores de referencia para el cálculo de $\Delta\delta H_\alpha$, $\Delta\delta C_\alpha$ y $\Delta\delta C_\beta$ los valores de desplazamientos químicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN experimentales recogidos por Sykes y colaboradores¹²¹ del residuo **X** en hexapéptidos GG**X**AGG estructurados al azar en disolución (X equivale a cada uno de los 20 aminoácidos proteínogénicos). Para los residuos no proteínogénicos de los extremos en los péptidos **1.13-1.21**, no se disponen de valores tabulados (excepto en el caso del Asp en **1.20** y **1.21**). En este caso, se escogió la Cys como residuo de referencia para todos los aminoácidos terminales, excluyendo a la Hag, para la cual se tomó como referencia a la Lys. Con todo ello, los valores de desplazamientos conformacionales observados para los residuos de los extremos de los péptidos **1.13-1.21** son orientativos y centramos el análisis en los residuos centrales del giro INNE.

En la Figura 1.33 se recogen los desplazamientos conformacionales de los protones $C_\alpha\text{H}$ y carbonos $^{13}\text{C}_\alpha$ y $^{13}\text{C}_\beta$ del péptido prototipo **1.12** centrándonos en los residuos centrales que mimetizan el giro (Ile2, Asn3, Asn4 y Glu5)⁶⁷. Como se puede observar, los valores de $\Delta\delta H_\alpha$ son negativos en la región del giro, mientras que son positivos en los extremos de la secuencia. Además, los desplazamientos conformacionales para los $^{13}\text{C}_\alpha$ y $^{13}\text{C}_\beta$ presentan signos opuestos entre sí para los residuos INNE, lo que indica la presencia de un giro o hélice α .

Para los péptidos cíclicos **1.13-1.21** se observan datos en valor absoluto iguales o superiores a 0.1 ppm y signos similares al prototipo **1.12**, lo que indicaría que estos péptidos se encontrarían estructurados en disolución de manera similar a **1.12** (Tablas 1.5-1.7).

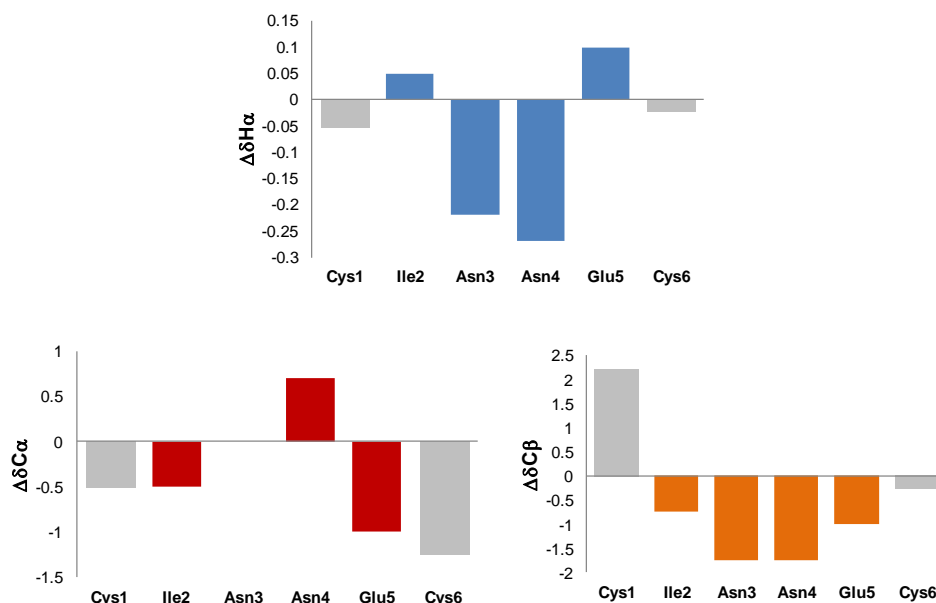


Figura 1.33 | Desplazamientos conformacionales de $C\alpha H$ (azul), $C\alpha$ (rojo) y $C\beta$ (naranja) para el prototipo **1.12** a pH 7.0 y 5 °C en $H_2O:D_2O$ (9:1)⁶⁷. Los valores de los residuos de los extremos se marcan en gris.

Los residuos de Asn3 y Asn4 en todos los péptidos muestran desplazamientos conformacionales de $C\alpha H$ negativos, de $C\alpha$ positivos y de $C\beta$ negativos, tendencia acorde con lo esperado para residuos presentes en un giro o hélice α . Sin embargo, se aprecian diferencias atendiendo a la naturaleza del cierre covalente presente en el péptido. Así, en la Figura 1.34 se comparan los desplazamientos conformacionales de los protones $C\alpha H$ de los cuatro residuos centrales (Ile-Asn-Asn-Glu) de los péptidos de la serie 1 (**1.13–1.17**) con el prototipo **1.12** de manera más gráfica. Como se puede observar, conforme aumenta la distancia entre los extremos del péptido cíclico, los valores absolutos de los $\Delta\delta$ se incrementan, quedando mejor definidas las Asn3 y Asn4 como residuos integrantes de un giro o hélice α . Así, mientras que en los péptidos **1.13a,b** (con a y b se indican los dos isómeros geométricos del cierre covalente) y **1.16** los valores de $\Delta\delta C\alpha H$ de las Asn3 y Asn4 no son significativos e inferiores a los que se observan en el prototipo **1.12**, la inserción de un metileno más en el

cierre covalente (péptidos **1.14a,b**, **1.15a,b** y **1.17**) hace que se incremente considerablemente el valor de $\Delta\delta C\alpha H$ en los dos residuos.

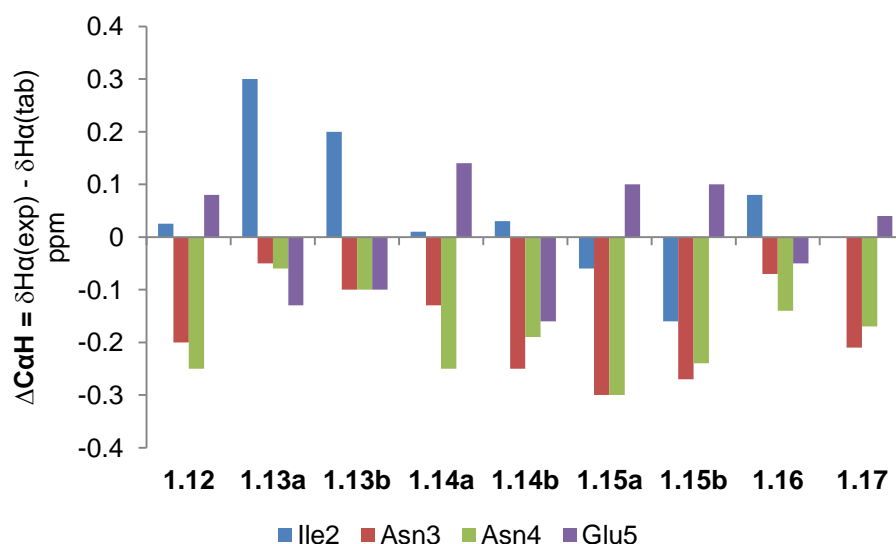


Figura 1.34 | Desplazamientos conformacionales ($\Delta C\alpha H$, ppm) de los residuos centrales de los péptidos de la serie 1 (**1.13–1.17**) y del prototipo **1.12**.

En el caso de los desplazamientos conformacionales de los protones $C\alpha H$ de los residuos centrales en los péptidos de las series 2 (**1.18** y **1.19**) y serie 3 (**1.20** y **1.21**) (Figura 1.34), los valores observados son semejantes los que presenta el prototipo **1.12** aunque algo inferiores en valor absoluto en el caso de los péptidos de la serie 3, los cuales contienen un enlace amida como cierre covalente.

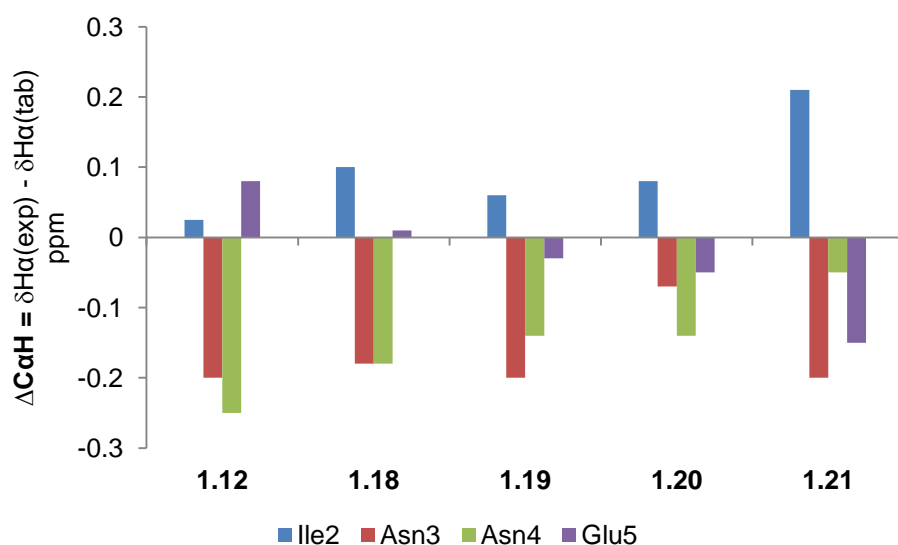


Figura 1.35 | Desplazamientos conformacionales ($\Delta C\alpha H$, ppm) de los residuos centrales de los péptidos de la serie 2 (1.18–1.19), de la serie 3 (1.20 y 1.21) y del prototipo 1.12.

Esta tendencia se observa igualmente al analizar los desplazamientos conformacionales de $C\alpha$ y $C\beta$ para los dos residuos de Asn3 y Asn4 en los mismos péptidos (Tablas 1.5 y 1.6). Aunque en todos ellos se observa un cambio de signo significativo para el mismo residuo cuando se comparan $\Delta\delta C\alpha$ y $\Delta\delta C\beta$ (lo que sugiere que estos residuos están involucrados en un giro o hélice α), de nuevo, dentro de los péptidos de la serie 1 (1.13–1.17), se observan en general unos mayores valores (en valor absoluto) al aumentar en un metileno la longitud del cierre covalente.

Por último, cabe destacar que los residuos Ile2 y Glu5 (aminoácidos de los extremos del giro) presentan valores de $\Delta\delta C\alpha H$ positivos, de signo contrario al que presentan las dos Asn centrales. Este hecho, ya observado en el prototipo 1.12 donde los residuos de Ile2 y Glu5 presentaban valores opuestos a los de Asn3 y Asn4⁶⁷, indicaría que los cuatro residuos Ile2-Asn3-Asn4-Glu5 forman parte de un giro o de una hélice α en los péptidos 1.13-1.21.

Tabla 1.5 | Desplazamientos conformacionales ($\Delta\delta$) de los C α H de los péptidos **1.13-1.21** (ppm) a pH 7.0 y 5 °C en H₂O:D₂O (9:1)*.

Residuo	1.13**		1.14**		1.15**		1.16	1.17	1.18	1.19	1.20	1.21
	a	b	a	b	a	b						
X_{aa}1	-0.31	-0.3	-0.41	-0.39	-0.39	-0.28	-0.03	-0.43	-0.12	0.14	0.04	-0.24
Ile2	0.30	0.20	0.01	0.03	-0.06	-0.16	0.08	0.00	0.10	0.06	0.08	0.21
Asn3	-0.05	-0.10	-0.13	-0.25	-0.30	-0.27	-0.07	-0.21	-0.18	-0.20	-0.07	-0.20
Asn4	-0.06	-0.10	-0.25	-0.19	-0.30	-0.24	-0.14	-0.17	-0.18	-0.14	-0.14	-0.05
Glu5	-0.13	-0.10	0.14	-0.16	0.10	0.10	-0.05	0.04	0.01	-0.03	-0.05	-0.15
X_{aa}6	-0.25	-0.40	-0.30	-0.25	-0.50	-0.48	-0.14	-0.40	0.41	0.01	-0.14	0.08

*Se asume un error experimental de 0.02 ppm para los desplazamientos conformacionales ($\Delta\delta$). **Se indican los dos isómeros (denominados como a y b) del doble enlace.

Tabla 1.6 | Desplazamientos conformacionales ($\Delta\delta$) de los C α de los péptidos **1.13-1.21** (ppm) a pH 7.0 y 5 °C en H₂O:D₂O (9:1)*.

Residuo	1.13**		1.14**		1.15**		1.16	1.17	1.18	1.19	1.20	1.21
	a	b	a	b	a	b						
X_{aa}1	2.6	0.3	-	2.0	1.9	-	0.0	1.2	0.7	-	-1.3	1.1
Ile2	0.7	-0.2	0.5	0.3	0.4	0.9	-0.1	0.3	-0.1	0.2	0.6	-0.1
Asn3	0.3	0.1	0.6	-	1.4	1.7	0.1	1.0	2.1	2.1	0.3	1.3
Asn4	0.4	0.1	1.2	0.9	3.0	1.4	0.1	1.4	1.7	3.3	1.4	1.3
Glu5	1.4	0.1	-2.3	1.3	-	-	0.1	-0.1	-0.3	0.0	0.4	1.1
X_{aa}6	-0.5	0.4	0.8	-1.3	-0.6		0.1	0.8	-	-1.8	0.7	-2.4

*Se asume un error experimental de 0.2 ppm para los desplazamientos conformacionales ($\Delta\delta$). **Se indican los dos isómeros (denominados como a y b) del doble enlace.

Tabla 1.7 Desplazamientos conformacionales ($\Delta\delta$) de los C β de los péptidos 1.13-1.21 (ppm) a pH 7.0 y 5 °C en H ₂ O:D ₂ O (9:1)*.												
Residuo	1.13**		1.14**		1.15**		1.16	1.17	1.18	1.19	1.20	1.21
	a	b	a	b	a	b						
X_{aa}1	-8.4	-	-7.37	-7.0	-4.1	-8.9	-1.5	-7.9	-11.1	-4.25	-1.5	2.0
Ile2	1.2	0.55	-0.19	-	-0.5	-1.0	0.1	-0.4	0.0	-0.41	0.1	0.6
Asn3	-0.9	-0.48	-0.64	-0.8	-0.6	-0.7	-0.5	-0.4	-0.5	-0.51	-0.5	-0.7
Asn4	-0.9	-0.58	-0.78	-0.7	-1.2	-0.6	-0.4	-0.4	-0.8	-0.47	-0.4	-0.6
Glu5	-0.7	-	-0.1	-1.0	-0.7	-0.8	-2.0	-0.5	-0.4	-0.05	-2.0	-0.1
X_{aa}6	-1.2	-	3.75	-2.0	-0.6	0	10.1	-7.6	-	-11.25	2.1	-1.4

*Se asume un error experimental de 0.2 ppm para los desplazamientos conformacionales ($\Delta\delta$). **Se indican los dos isómeros (denominados como a y b) del doble enlace.

1.5.3. Coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\Delta T$)

La RMN permite determinar de forma indirecta la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares en una molécula mediante la determinación del **coeficiente de temperatura** ($\Delta\delta/\delta T$) para un determinado protón ($\text{ppm}\cdot\text{K}^{-1}$). Éste, se define como la pendiente de la variación del desplazamiento químico de un protón en función de la temperatura¹²². De todos los protones presentes en un péptido, los de naturaleza amídica son los más sensibles a cambios de temperatura. En este sentido, si un protón amídico se encuentra protegido del disolvente (potencialmente comprometido en un enlace de hidrógeno intramolecular, difícilmente se intercambiará con los protones del disolvente al variar la temperatura, y su coeficiente de temperatura será cercano a cero. Según la bibliografía¹²³, aquellos valores de $\Delta\delta/\delta T$, en valor absoluto, menores o iguales que $3\cdot 10^{-3} \text{ ppm}\cdot\text{K}^{-1}$, son indicativos de que el NH amida está protegido del disolvente y podría estar involucrado en un enlace de hidrógeno intramolecular, valores superiores a $4\cdot 10^{-3} \text{ ppm}\cdot\text{K}^{-1}$ indicarían que el NH amida está expuesto al disolvente y aquellos comprendidos entre $3\cdot 10^{-3}$ y $4\cdot 10^{-3} \text{ ppm}\cdot\text{K}^{-1}$ no serían concluyentes.

En la Tabla 1.8 se recogen los valores de los coeficientes de temperatura obtenidos para todos los péptidos **1.13-1.21** y para el péptido prototipo **1.12**. Como se puede observar, la mayoría de los protones amida del esqueleto peptídico de los residuos en **1.13-1.21** y en **1.12** presentarían valores de $\Delta\delta/\delta T$ en valor absoluto superiores a $4 \text{ ppm}\cdot\text{K}^{-1}$, siendo por tanto accesibles al disolvente. Sin embargo, en el caso del HN del Glu5 se observa la tendencia contraria.

Tabla 1.8 | Coeficientes de temperatura de los protones amida NH ($\Delta\delta/\Delta T \cdot 10^{-3}$, ppm·K⁻¹) medidos a 5 y 25 °C de los péptidos **1.13-1.21** y del prototipo **1.12** en H₂O:D₂O (9:1)*.

Residuo	1.12	1.13**		1.14**		1.15**		1.16	1.17	1.18	1.19	1.20	1.21
		a	b	a	b	a	b						
X_{aa}1	7.5	6.5	10.2	8.5	8.3	8.5	7.6	8.5	8.2	8.5	11.2	0.1	8.1
Ile2	9.5	8.4	5.2	8.5	8.2	10.1	9.3	7.4	7.7	5.5	5.2	7.7	4.3
Asn3	5.0	-	3.0	7.4	6.7	7.4	8.4	6.0	8.0	5.8	18.3	15.4	18.7
CONH ₂	6.5, 5.0	-	-	-	-	-	-	4.9, 6.3	4.8, 6.1	5.0, 6.7	4.8, 6.6	4.7, 6.4	5.3, 6.7
Asn4	4.5	4.5	4.0	18.7	8.9	18.7	4.5	7.2	7.8	9.0	8.3	6.9	4.0
CONH ₂	6.0, 5.0	-	-	-	-	-	-	4.8, 4.8	4.8, 6.6	4.6, 5.8	4.5, 6.0	7.1, 5.9	4.9, 5.9
Glu5	1.0	4.4	2.5	0.9	0.1	0.9	3.0	3.4	2.5	2.9	3.6	2.4	5.9
X_{aa}6	7.0	9.5	4.5	6.8	3.3	6.8	7.7	5.4	7.6	5.6	5.8	6.6	7.2
CONH₂ terminal	5.5, 6.5	-	-	-	-	-	-	6.9, 5.2	6.8, 5.4	6.6, 5.3	0.8, 0.3	5.8, 4.2	6.4, 1.5
NH cierre covalente												7.1	8.4

* Si se asume un error para $\Delta\delta$ de 0.01 ppm, el error asociado a $\Delta\delta/\Delta T$ sería de $\pm 0.5 \cdot 10^{-3}$ ppm·K⁻¹. Se indican en negrita aquellos valores menores que $4 \cdot 10^{-3}$ ppm·K⁻¹. **Se indican los dos isómeros (denominados como a y b) del doble enlace.

En la Figura 1.35 se representan de manera más gráfica los valores de $\Delta\delta/\delta T$ para este NH en todos los péptidos, observándose en general valores inferiores a 3 ppm·K⁻¹ que indicarían que estaría protegido del disolvente. Ello podría indicar la presencia de un potencial enlace de hidrógeno entre este HN (dador) y un aceptor de enlace de hidrógeno dentro del péptido. Este hecho ya se observaba previamente en el prototipo **1.12**, donde se proponía un enlace de hidrógeno entre el HN del Glu5 y el oxígeno carbonílico de la Ile2 (aceptor).

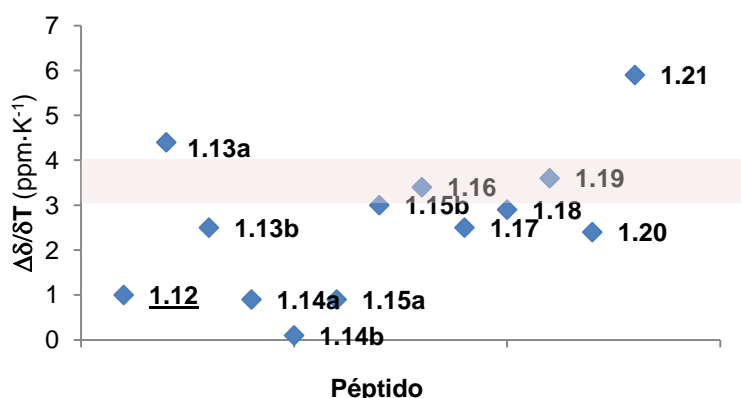


Figura 1.35 | Coeficientes de temperatura ($\Delta\delta/\delta T$, ppm·K⁻¹) del HN del residuo de Glu5 en los péptidos **1.13–1.21** y en el prototipo **1.12**.

Por otro lado, y en cuanto a los protones amida de las cadenas laterales de las Asn3 y Asn4 serían accesibles al disolvente, ya que sus coeficientes de temperatura son superiores a 4.0 ppm·K⁻¹ al igual que ocurría en el prototipo **1.12**. Tampoco parecen estar implicados en un enlace de hidrógeno intramolecular los protones amida del cierre covalente en los péptidos **1.20** y **1.21** (son fácilmente accesibles al disolvente), lo que podría significar una nueva interacción potencial a posteriori con la enzima. Por último, cabe destacar que en el caso de uno de los triazoles (serie 2, **1.19**), los protones de la carboxamida terminal estarían fuertemente protegidos del disolvente.

En conclusión, el análisis de los valores de $\Delta\delta/\delta T$ para los protones amida presentes en los péptidos **1.13–1.21** muestra la tendencia general de que el NH del Glu5 es poco accesible al disolvente y podría estar implicado en la formación de

un enlace de hidrógeno intramolecular. Este hecho, ya observado en el prototipo **1.12**, no se ve influenciado en gran manera por la naturaleza del cierre covalente.

1.5.4. Efecto nuclear Overhauser (NOE)

Cuando dos núcleos se encuentran próximos en el espacio (a una distancia inferior de 4.5-5.0 Å), en RMN se puede dar un proceso de transferencia de magnetización de uno a otro. Este fenómeno se conoce como efecto nuclear Overhauser (NOE). Entre otros factores, el efecto NOE depende de la distancia a la que se encuentran los núcleos, siendo más intenso cuanto más próximos estén espacialmente. En este sentido, las señales de tipo NOE son una herramienta básica para el análisis estructural mediante RMN¹¹⁷ ya que permiten cuantificar cómo de próximos o alejados se encuentran dispuestos los átomos espacialmente. En un péptido, los NOE observados se pueden dividir en dos grupos, atendiendo a la distancia que separe a los dos núcleos entre los cuales ocurre la transferencia de magnetización: (i) señales de *corto alcance* y (ii) de *medio-largo alcance*. Al primer grupo pertenecen las señales de NOEs intrarresiduales, entre núcleos presentes en el mismo aminoácido. En el segundo grupo, estarían incluidos los NOEs secuenciales y no secuenciales, que se diferencian según se dé la transferencia de magnetización con un núcleo presente en un aminoácido inmediatamente adyacente en la secuencia peptídica (secuenciales), o con un núcleo presente en una aminoácido más alejado (no secuenciales). Son este último tipo de NOEs, los de medio-largo alcance no secuenciales, los que desde el punto de vista del cálculo de estructura son claves, ya que restringen el espacio conformacional del péptido.

El número de señales tipo NOE en los espectros $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY para los péptidos **1.13-1.21** era reducida, debido a que se encuentran en torno a 700 Da, peso molecular que cae dentro de la región en la cual los valores de NOE se anulan. Para pesos moleculares menores, los valores de NOE son positivos mientras que son de signo negativo para pesos moleculares superiores. Por tanto, ante el número pequeño de señales NOE observado para los péptidos **1.13-1.21**, se adquirieron espectros $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY. A diferencia de los picos NOE, los ROE

son siempre positivos, aunque en principio de menor intensidad. En la Tabla 1.9 se recogen las señales de tipo NOE/ROE representativas observadas en los péptidos **1.13-1.21**.

Tabla 1.9 | NOE/ROEs de medio y largo alcance significativos observados para los péptidos **1.13-1.21** en disolución acuosa a pH 7.0 y 5°C.

<i>Residuo</i>	<i>Residuo</i>	<i>Intensidad</i>
1.12 (prototipo)		
Ile2 HN	Glu5 HB2	medio-débil
Ile2 HN	Glu5 HB3	medio-débil
Asn3 HB2	Glu5 HN	muy débil
Asn3 HB3	Glu5 HN	muy débil
SERIE 1		
1.13a		
Ile2 HA	Gly6 HN	medio
Gly1 HA	Glu5 HB2/HB3	medio
Asn4 HA	Glu5 HG2	medio
Asn4 HA	Gly6 CONH ₂	fuerte
1.13b		
Gly1 HA	Asn4 HN	fuerte
Ile2 HA	Gly6 HN	medio
Asn4 HA	Gly6 HN	medio
1.14a		
Glu5 HA	Ile2 HN	medio-débil
Gly1 HN	Glu5 HB3	fuerte
Asn4 HA	Gly1 QB	medio
1.14b		
Asn3 HA	Gly1 HN	medio
Glu5 HA	Asn3 HN	medio
Gly6 HB2/HB3	Asn3 HB3	medio
Ile2 HB	Asn4 HB2	medio
Glu5 HB2	Asn3 HN	fuerte
1.15a		
Asn4 HA	Gly6 HN	medio
Ile2 QD1	Asn4 HD21	débil
1.15b		
Glu5 HG3	Ile2 HN	medio
Ile2 HN	Glu5 HG3	débil
Glu5 HB2	Ile2 HN	medio-débil
1.16		
Gly1 HG2	Asn3 HN	medio
Gly1 HG2	Asn3 QB	medio
Ile2 HG13	Gly6 HD22	medio
Asn3 QB	Glu5 HN	medio
Glu5 HB2	Gly1 HN	fuerte
Glu5 HB2	Asn3 HN	medio

<i>(continuación Tabla 1.9)</i>		
1.17		
Gly1 HB2	Asn3 HD22	medio
Gly6 HB2	Asn3 HB2	medio
Asn4 HN	Ile2 HA	medio
SERIE 2		
1.18		
Asn4 QB	Gly1 HN	medio
Gly1 QB	Glu5 HB3	medio
Ile2 HG12	Glu5 HN	medio-débil
1.19		
Gly6 HA	Ile2 HN	medio
Ac Gly1	Glu5 HN	medio
Gly1 HA	Glu5 HB3	medio
Gly1 QB	Glu5 HB3	medio
Ile2 QG2	Glu5 QG	medio
Asn3 HA	Gly6 HD	medio
SERIE 3		
1.20		
Asn4 HB2	Ile2 HN	medio
Asn4 HB2	Gly6 HE	medio
Asp1 HA	Glu5 HG3	débil
1.21		
Asn4 HA	Asp6 HN	medio

En el análisis de las señales de tipo NOE/ROE en los espectros bidimensionales NOESY y ROESY para los péptidos **1.13-1.21**, se observa, en primer lugar, que es entre los residuos de los extremos (los que participan en el cierre covalente) en los que se establecen el mayor número de NOE/ROEs. Además, estas señales son, como norma general, de intensidad media ó media-alta. Sin embargo, también se observan NOE/ROEs de medio-largo alcance no secuenciales.

En la Figura 1.36 se esquematiza a modo de ejemplo algunos de esos NOE/ROEs no secuenciales más significativos para los péptidos **1.13a** (isómero de **1.13**, serie 1), **1.17** (serie 1), **1.18** (serie 2) y **1.20** (serie 3) y se comparan con los observados en el prototipo **1.12**. Así, las señales de tipo NOE/ROEs entre la cadena lateral del Glu5 y los residuos Gly1 ó Ile2 indican que estos residuos se encuentran próximos. Los coeficientes de temperatura de los péptidos **1.13-1.21**

indicaban que el NH del Glu5 no estaba expuesto al disolvente, y por tanto, podría estar implicado en un enlace de hidrógeno intramolecular.

Los NOE/ROEs observados nos ayudan a determinar que el átomo aceptor de dicho enlace de hidrógeno podría ser el oxígeno carbonílico de la Ile2 de manera similar a cómo ocurriría en el prototipo **1.12**⁶⁷.

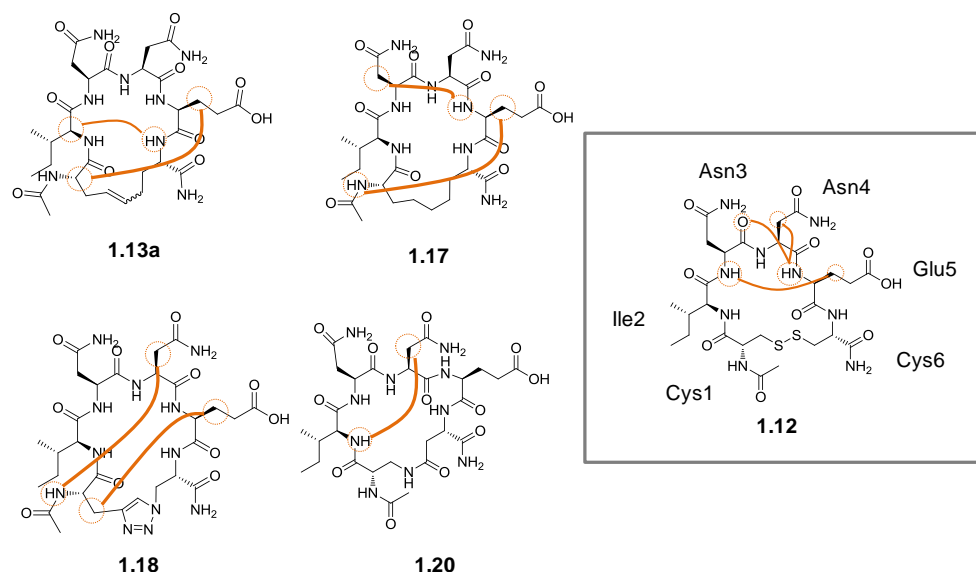


Figura 1.36 | Algunos NOE/ROEs significativos para los péptidos **1.13a** (serie 1), **1.17** (serie 1), **1.19** (serie 2) y **1.20** (serie 3) y para el péptido prototipo **1.12**. Con flechas rojas se indican los NOEs y con la flecha verde, el potencial enlace de hidrógeno entre el NH del Glu5 y el CO de la Ile2.

1.5.5. Cálculo de estructura usando el programa CYANA¹²⁴

Por último, nos propusimos llevar a cabo el cálculo del conjunto de estructuras de los péptidos **1.13-1.21** que fueran compatibles con los datos experimentales observados en sus espectros de RMN en disolución. Los cálculos se llevaron a cabo usando el programa CYANA¹²⁴, en el cual, a partir de datos experimentales derivados de los espectros de RMN introducidos en el programa en forma de restricciones geométricas (distancias, ángulos y enlaces), se pueden obtener un conjunto de estructuras que satisfagan estas condiciones. Al final se

obtiene una lista jerarquizada de estructuras, ordenadas en base a una función estadística de pesada. Para determinar la calidad en la determinación estructural por RMN, se emplea como parámetro la desviación cuadrática media (RMSD) en la superposición de los átomos de las distintas conformaciones calculadas¹²⁵. Valores menores de 1.0 indicarían una buena calidad en la superposición, y por lo tanto, una estructuración del péptido en torno a una conformación definida en disolución.

Las restricciones geométricas que se suelen introducir para el cálculo de estructura de proteínas usando el programa CYANA son:

- a) *Restricciones de distancia*. Vienen impuestas por los NOE/ROEs observados experimentalmente. Ahora bien, no todos ellos se emplean para el cálculo de estructura. En concreto, se seleccionan los no secuenciales de medio-largo alcance, como se comentó previamente, ya que las intensidades de los secuenciales puede tener contribuciones de estructuras al azar (*random coil*).
- b) *Restricciones de ángulo*. Junto con las restricciones de distancia, se introducen unos rangos de valores posibles para los ángulos diedros de los residuos presentes en el péptido. Es común en el cálculo de estructura de proteínas determinar unas restricciones de ángulos diedros ϕ y ψ en base a los desplazamientos químicos de ^1H , $^{13}\text{C}\alpha$ y $^{13}\text{C}\beta$ observados usando el programa híbrido TALOS¹²⁶ (su versión más reciente es TALOS+¹²⁷), que se basa en la relación empírica existente entre dichos desplazamientos químicos y los ángulos diedros.
- c) *Restricción de enlace entre los extremos*. La presencia del enlace covalente entre los extremos del péptido supone una restricción del sistema peptídico.

En este caso, no fue posible el cálculo de restricciones angulares empleando el programa TALOS debido a que la longitud de los péptidos **1.13-1.21** no alcanza el mínimo requerido para un funcionamiento correcto del programa. Por tanto, se definieron de forma manual los ángulos diedros dentro de un amplio rango, pero restringidos a las zonas más pobladas del mapa de Ramachandran¹²⁸. En concreto, para los péptidos **1.13-1.21** se introdujeron restricciones para el

ángulo ϕ de los residuos Gly1, Ile2, Glu5 y Gly6 (valores entre -180° y 0°). Para los residuos de Asn, no se introdujeron restricciones angulares. Como restricciones de enlace entre los extremos se introdujeron cotas superiores e inferiores de distancia para los cierres hidrocarbonados, triazol y amida.

Dado que los péptidos **1.13-1.21** contienen residuos no naturales (derivados de Dap, Gly(alil), Hag, Pra, Pra(N₃)) que no están incluidos en las librerías del programa CYANA, para poder calcular las estructuras de estos péptidos los residuos no naturales se introdujeron como el aminoácido natural más semejante. Así, los residuos derivados de Dap, Gly(alil), Pra y Pra(N₃) se nombraron como Cys, y los derivados de Hag, como Lys.

En la Figura 1.37 se representan las superposiciones de las 20 mejores estructuras calculadas para los péptidos **1.13-1.21** así como los valores de RMSD para la superposición de los átomos del esqueleto peptídico y la de todos los átomos pesados, incluyendo las cadenas laterales. Estas estructuras no violan ninguna de las restricciones de distancia en más de 0.5 Å ni las restricciones de ángulo diedro impuestas en la superposición. Como se puede observar, las estructuras de todos los péptidos presentan unos valores de RMSD en la superposición del esqueleto peptídico menores que 1.0, lo que indica una buena calidad en la superposición y que los péptidos **1.13-1.21** pueblan mayoritariamente en disolución una sola estructura de forma definida. Como cabe esperar, los valores de RMSD para las cadenas laterales son superiores, pues tienen mayores grados de libertad. Además, los valores obtenidos en el cálculo de estructura para el péptido prototipo **1.12**, son similares a los obtenidos para **1.13-1.21**.

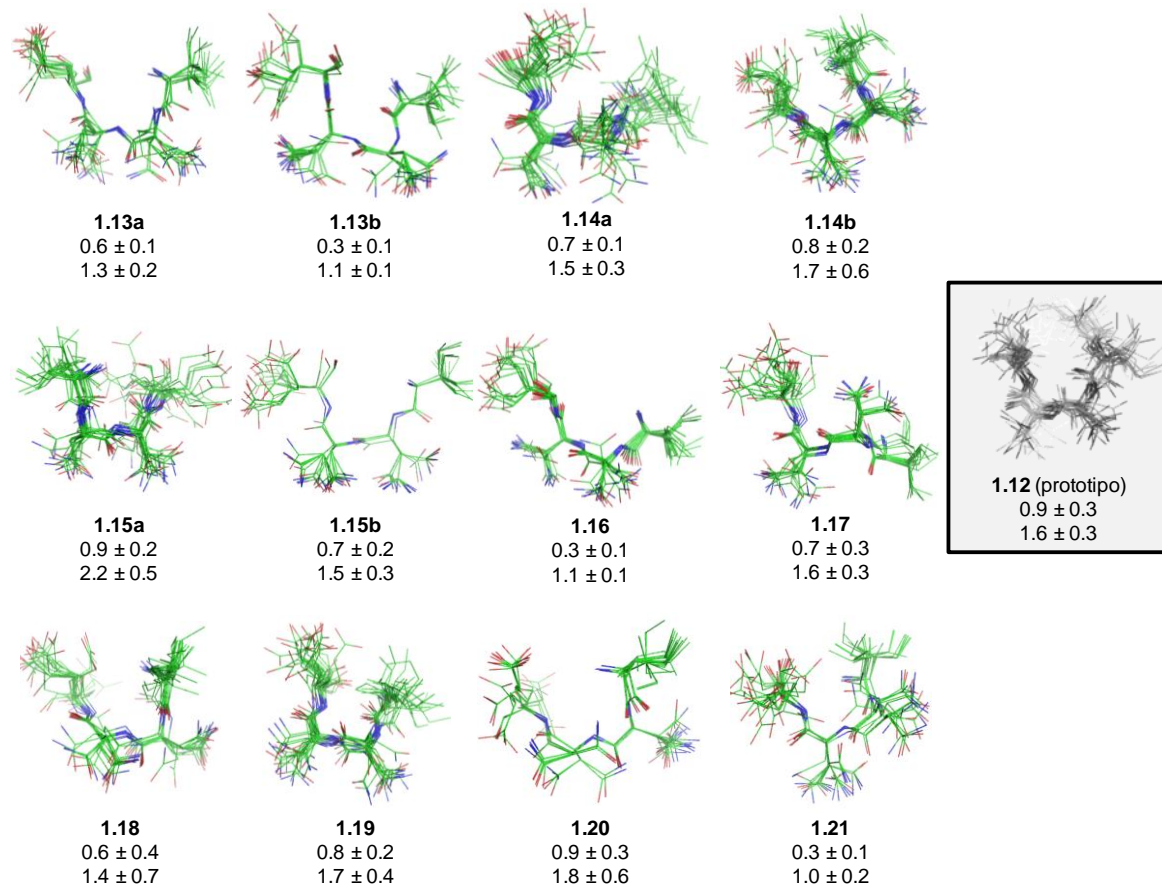


Figura 1.37 | Superposición de las 20 mejores estructuras calculadas para los péptidos **1.13-1.21** y el prototipo **1.12**⁶⁷ usando el programa CYANA. Se indican los valores de RMSD para la superposición de los átomos del esqueleto peptídico (arriba) y los valores de RMSD para la superposición de todos los átomos pesados (abajo).

Seguidamente, con el fin de determinar el grado de similitud estructural de los péptidos sintetizados **1.13-1.21** con el asa $\beta 7/\beta 8$ de la proteína nativa (TI del VIH-1), se llevó a cabo la superposición de esta región de la enzima con la estructura promedio de las 20 mejores estructuras obtenidas en el cálculo de estructura (Figura 1.38). En concreto, se seleccionaron los residuos de INNE contenidos en el péptido cíclico para su superposición.

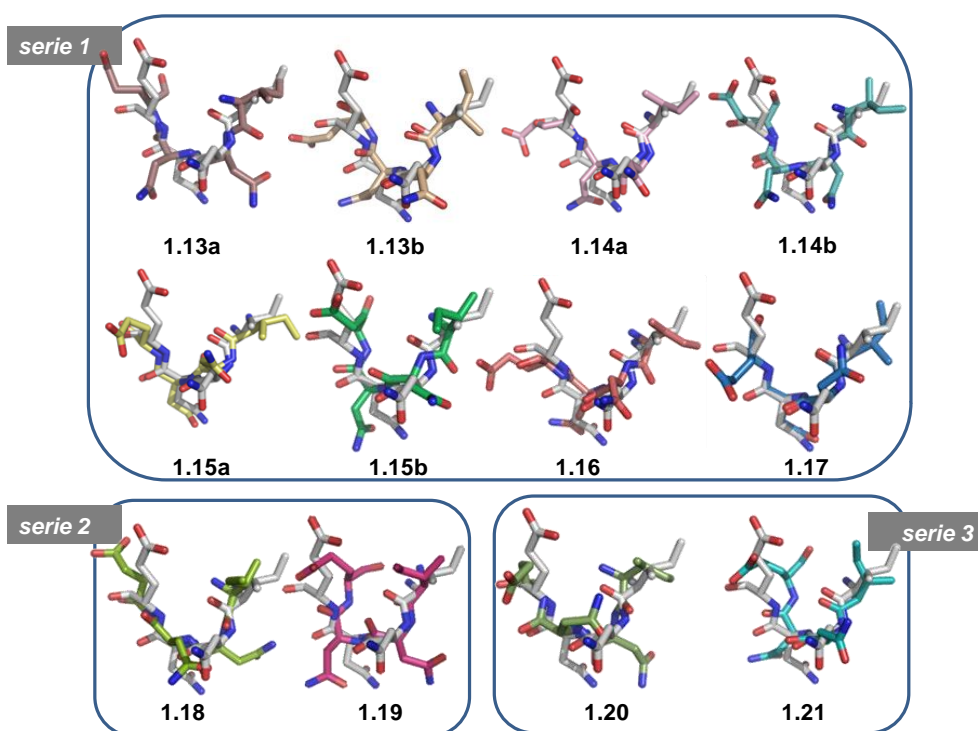


Figura 1.38 | Superposición de la mejores estructuras calculadas para **1.13a-1.17** (serie 1, dicarba análogos), **1.18** y **1.19** (serie 2, triazoles) y **1.20** y **1.21** (serie 3, amidas) con el asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 del VIH-1 (esqueleto en gris). Sólo se han superpuesto los residuos IENNs del giro.

Los valores de la calidad de la superposición (RMSD) se indican en la Tabla 1.10. Hay que destacar que se observan diferencias significativas en los valores de RMSD de la superposición de los péptidos cíclicos con el asa $\beta 7/\beta 8$. En primer lugar, el péptido **1.17**, portador de un cierre covalente hidrocarbonado

saturado de cinco metilenos (serie 1), presenta en disolución una gran similitud con el asa al igual que el prototipo **1.12** (0.2 vs 0.5). Así, las cadenas laterales de los dos residuos centrales de Asn coinciden casi exactamente con la disposición de las Asn136 y 137 en la proteína (Figura 1.37). El resto de los péptidos presentan un grado de superposición semejante a **1.12** observándose diferencias según la naturaleza del cierre covalente.

Dentro de los péptidos de la serie 1, portadores de cierres covalentes hidrocarbonados (**1.13-1.17**), se observa que la longitud del cierre covalente es importante. Así, el péptido portador de un puente hidrocarbonado saturado de cuatro metilenos (**1.16**) muestra una superposición con el asa peor que el correspondiente péptido con cinco metilenos (**1.17**) que como hemos comentado anteriormente era el que presentaba una mejor similitud con el asa de la proteína nativa. En cuanto a los cierres covalentes insaturados, en la superposición de los péptidos **1.15a,b** con el asa se observan valores de RMSD similares al prototipo no observándose diferencias en la geometría del doble enlace (isómeros E y Z). Sin embargo, el resto de péptidos portadores de puentes C=C presentan valores de RMSD superiores a 1 (Tabla 1.10). En cuanto a los péptidos de las series 2 y 3, el péptido **1.21** portador de un cierre amida (NHCO) presenta un valor de RMSD semejante al prototipo, mientras que un cambio en la orientación del cierre covalente amida (péptido **1.20**), se traduce en una pérdida de similitud con el asa (0.6 vs 1.6). Los péptidos portadores de un anillo de 1,2,3-triazol en el cierre covalente **1.18** y **1.19** (serie 3) dan lugar a estructuras que presentan valores de RMSD superiores a 1.0 (Tabla 1.10).

Como se mencionó anteriormente, los experimentos NOE/ROEs nos ayudaron a proponer un enlace de hidrógeno entre el protón amídico del Glu5 (NH) y el oxígeno carbonílico (CO) de la Ile2. En la Figura 1.39 se ilustra en detalle el enlace de hidrógeno propuesto en la superposición de la estructura promedio del péptido **1.17** con el asa.

Tabla 1.10 | Péptidos **1.13-1.21** ordenados según sus valores de RMSD en la superposición de la mejor estructura con el asa $\beta 7/\beta 8$ del VIH-1.

Péptido	RMSD (Å)		
	Cierre covalente	Esqueleto peptídico	Cadenas laterales
1.17	$(CH_2)_5$	0.2	1.4
1.12 (prototipo)	S-S	0.5	1.2
1.21	$CH_2NHCOCH_2$	0.6	1.5
1.15a	$CH_2-CH=CH-(CH_2)_2$	0.7	1.5
1.15b	$CH_2-CH=CH-(CH_2)_2$	0.8	1.9
1.16	$(CH_2)_4$	0.9	1.8
1.14a	$(CH_2)_2-CH=CH-CH_2$	1.0	1.7
1.13b	$CH_2-CH=CH-CH_2$	1.0	1.7
1.19	$CH_2-\Psi(1\rightarrow4\text{-triazol})-CH_2$	1.3	2.6
1.20	$CH_2CONHCH_2$	1.6	2.3
1.13a	$CH_2-CH=CH-CH_2$	1.7	3.0
1.18	$CH_2-\Psi(4\rightarrow1\text{-triazol})-CH_2$	1.8	2.6
1.14b	$(CH_2)_2-CH=CH-CH_2$	1.8	3.0

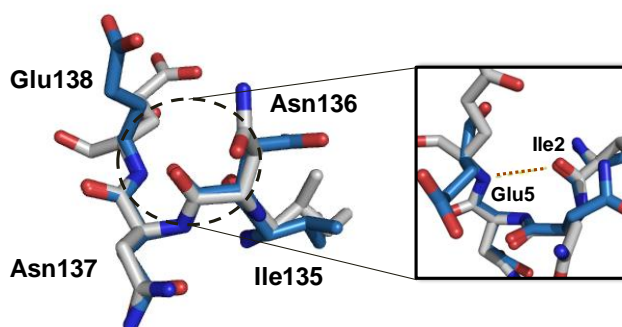


Figura 1.39 | Superposición del péptido **1.17** (azul) con el asa $\beta 7/\beta 8$ de la TI del VIH-1 (gris) y detalle del posible enlace de hidrógeno intramolecular entre el Glu5 y Ile2.

Finalmente, cuando se miden las distancias entre el nitrógeno amídico del Glu5 y el oxígeno carbonílico de la Ile2 en las estructuras promedio calculadas para todos los péptidos cíclicos **1.13-1.21** y para el prototipo **1.12**, se observa que los péptidos estructurados de manera más similar al asa **1.17** y **1.21**, son los que

muestran las menores distancias (cercanas a 2 Å) que son compatibles con la existencia de dicho enlace de hidrógeno.

En conclusión, la sustitución del puente disulfuro del péptido prototipo **1.12** por otros tipos de cierre covalente en los péptidos **1.13-1.21** se ha traducido en la obtención de péptidos cíclicos con una conformación definida en disolución alrededor de la secuencia IENNs similar a la obtenida en el prototipo. La naturaleza del cierre covalente, su orientación, su longitud y su flexibilidad, afectan al grado de similitud de los péptidos cíclicos con el asa $\beta 7/\beta 8$ de la proteína nativa. Destaca el péptido **1.17**, portador de un cierre hidrocarbonado saturado de cinco metilenos, el cual es el que presenta la estructura más similar a la proteína nativa.

1.6. Evaluación biológica *in vitro* de los péptidos 1.13-1.21 como inhibidores del proceso de la dimerización de la TI del VIH-1

Los péptidos sintetizados en la presente Tesis están pendientes de ser evaluados como inhibidores de la dimerización de la TI del VIH-1. Al comienzo de la presente Tesis, se contaba con la colaboración del Dr. Sluis-Cremer de la Universidad de Pittsburg (EE UU), tal y como se comenta en el apartado de Antecedentes. Sin embargo, el Dr. Sluis-Cremer cerró su programa de ensayo de inhibidores de la dimerización de la TI del VIH-1. Actualmente se están implementando en el grupo del Prof. Dr. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá, con la ayuda del Dr. Sluis-Cremer que facilitó los plásmidos de expresión, el ensayo enzimático para evaluar el efecto de nuestros péptidos sobre el proceso de la dimerización de la TI del VIH-1. La puesta a punto de estos ensayos está resultando ser un reto importante. En paralelo, en nuestro grupo se pretende evaluar de una forma directa la interacción de los péptidos con la enzima mediante ensayos de resonancia de plasmón de superficie (SPR) que acaban de iniciarse.

1.7. Bibliografía

1. Patrick, G. L., *An introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford: Nueva York, 2009.
2. (a) Mount, C.; Downton, C., Alzheimer disease: progress or profit? *Nat. Med.* **2007**, *12*, 780-784; (b) Manuelidis, E.; Gorgacs, E.; Manuelidis, L., Viremia in experimental Creutzfeldt-Jakob disease. *Science* **1978**, *200*, 1069-1071.
3. Guenard, D.; Guerittevoegelein, F.; Potier, P., Taxol and taxotere - Discovery, chemistry and structure-activity-relationships. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 160-167.
4. Downing, K. H., Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2000**, *16*, 89-111.
5. (a) Downing, K. H.; Nogales, E., New insights into microtubule structure and function from the atomic model of tubulin. *Eur. Biophys. J.* **1998**, *27*, 431-436; (b) Uppuluri, S.; Knipling, L.; Sackett, D. L.; Wolff, J., Localization of the colchicine-binding site of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 11598-11602; (c) Bai, R.; Pei, X. F.; Boye, O.; Getahun, Z.; Grover, S.; Bekisz, J.; Nguyen, N. Y.; Brossi, A.; Hamel, E., Identification of cysteine 354 of beta-tubulin as part of the binding site for the A ring of colchicine. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12639-12645.
6. (a) Jones, S.; Thornton, J. M., Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 13-20; (b) Jubb, H.; Higuieruelo, A. P.; Winter, A.; Blundell, T. L., Structural biology and drug discovery for protein-protein interactions. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 241-248; (c) Stites, W. E., Protein-protein interactions: Interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1233-1250.
7. Schmidtke, P.; Barril, X., Understanding and Predicting Druggability. A High-Throughput Method for Detection of Drug Binding Sites. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5858-5867.
8. Hopkins, A. L.; Groom, C. R., The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 727-730.
9. Mullard, A., Protein-protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 173-175.

10. (a) Thangudu, R. R.; Bryant, S. H.; Panchenko, A. R.; Madej, T., Modulating protein-protein interactions with small molecules: the importance of binding hotspots. *J. Mol. Biol.* **2012**, *415*, 443-453; (b) Morelli, X.; Bourgeas, R.; Roche, P., Chemical and structural lessons from recent successes in protein-protein interaction inhibition (2P2I). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 475-481.
11. (a) Ma, B.; Elkayam, T.; Wolfson, H.; Nussinov, R., Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 5772-5777; (b) DeLano, W. L., Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 14-20; (c) Veselovsky, A. V.; Ivanov, Y. D.; Ivanov, A. S.; Archakov, A. I.; Lewi, P.; Janssen, P., Protein-protein interactions: mechanisms and modification by drugs. *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 405-422.
12. Clackson, T.; Wells, J., A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **1995**, *267*, 383-386.
13. Liskamp, R. M. J.; Rijkers, D. T. S.; Kruijtzter, J. A. W.; Kemmink, J., Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1626-1653.
14. (a) Petros, A. M.; Nettesheim, D. G.; Wang, Y.; Olejniczak, E. T.; Meadows, R. P.; Mack, J.; Swift, K.; Matayoshi, E. D.; Zhang, H. C.; Thompson, C. B.; Fesik, S. W., Rationale for Bcl-x(L)/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 2528-2534; (b) Sattler, M.; Liang, H.; Nettesheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Shuker, S. B.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; Thompson, C. B.; Fesik, S. W., Structure of Bcl-x(L)-Bak peptide complex: Recognition between regulators of apoptosis. *Science* **1997**, *275*, 983-986.
15. Adams, J. M.; Cory, S., The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* **1998**, *281*, 1322-1326.
16. Baek, S.; Kutchukian, P. S.; Verdine, G. L.; Huber, R.; Holak, T. A.; Lee, K. W.; Popowicz, G. M., Structure of the Stapled p53 Peptide Bound to Mdm2. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *134*, 103-106.

17. Wolber, G.; Seidel, T.; Bendix, F.; Langer, T., Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 23-29.
18. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 935-949.
19. (a) Walensky, L. D., From mitochondrial biology to magic bullet: navitoclax disarms BCL-2 in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 554-557; (b) Chen, J.; Zhou, H.; Aguilar, A.; Liu, L.; Bai, L.; McEachern, D.; Yang, C.-Y.; Meagher, J. L.; Stuckey, J. A.; Wang, S., Structure-Based Discovery of BM-957 as a Potent Small-Molecule Inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xL Capable of Achieving Complete Tumor Regression. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8502-8514; (c) Tse, C.; Shoemaker, A. R.; Adickes, J.; Anderson, M. G.; Chen, J.; Jin, S.; Johnson, E. F.; Marsh, K. C.; Mitten, M. J.; Nimmer, P.; Roberts, L.; Tahir, S. K.; Mao, Y.; Yang, X.; Zhang, H.; Fesik, S.; Rosenberg, S. H.; Elmore, S. W., ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 3421-3428.
20. California, C.-N. Y. C. a., Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men. *MMWR CDC Surveill. Summ.* **1981**, *30*, 305--308.
21. UNAIDS *World AIDS Day Report 2011*; 2011.
22. (a) Sepkowitz, K. A., AIDS--the first 20 years. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1764-1772; (b) Pomerantz, R. J.; Horn, D. L., Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 867-873; (c) Fauci, A. S., HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 839-843.
23. (a) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, *220*, 868-871; (b) Popovic, M.; Sarngadharan, M. G.; Read, E.; Gallo, R. C., Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **1984**, *224*, 497-500; (c) Gallo, R. C.; Salahuddin, S. Z.; Popovic, M.; Shearer, G. M.; Kaplan, M.; Haynes, B. F.; Parker, T. J.; Redfield, R.; Oleske, J.; Safai, B.; et al., Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.

Science **1984**, 224, 500-503; (d) Broder, S.; Gallo, R. C., A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N. Engl. J. Med.* **1984**, 311, 1292-1297.

24. (a) Saag, M. S.; Kilby, J. M., HIV-1 and HAART: A time to cure, a time to kill. *Nat. Med.* **1999**, 5, 609-611; (b) Kalkut, G., Antiretroviral therapy: an update for the non-AIDS specialist. *Curr. Opin. Oncol.* **2005**, 17, 479-484; (c) Autran, B.; Carcelain, G.; Li, T. S.; Blanc, C.; Mathez, D.; Tubiana, R.; Katlama, C.; Debre, P.; Leibowitch, J., Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* **1997**, 277, 112-116.

25. (a) Valdez, H., Immune restoration after treatment of HIV-1 infection with highly active antiretroviral therapy (HAART). *AIDS Rev.* **2002**, 4, 157-164; (b) Brodt, H. R.; Kamps, B. S.; Gute, P.; Knupp, B.; Staszewski, S.; Helm, E. B., Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy. *AIDS* **1997**, 11, 1731-1738.

26. (a) Guerra, S.; González, J. M.; Climent, N.; Reyburn, H.; López-Fernández, L. A.; Nájera, J. L.; Gómez, C. E.; García, F.; Gatell, J. M.; Gallart, T.; Esteban, M., Selective Induction of Host Genes by MVA-B, a Candidate Vaccine against HIV/AIDS. *J. Virol.* **2010**, 84, 8141-8152; (b) García, F.; Bernaldo de Quirós, J. C. L.; Gómez, C. E.; Perdiguero, B.; Nájera, J. L.; Jiménez, V.; García-Arriaza, J.; Guardo, A. C.; Pérez, I.; Díaz-Brito, V.; Conde, M. S.; González, N.; Alvarez, A.; Alcamí, J.; Jiménez, J. L.; Pich, J.; Arnaiz, J. A.; Maleno, M. J.; León, A.; Muñoz-Fernández, M. A.; Liljestrom, P.; Weber, J.; Pantaleo, G.; Gatell, J. M.; Plana, M.; Esteban, M., Safety and immunogenicity of a modified pox vector-based HIV/AIDS vaccine candidate expressing Env, Gag, Pol and Nef proteins of HIV-1 subtype B (MVA-B) in healthy HIV-1-uninfected volunteers: A phase I clinical trial (RISVAC02). *Vaccine* **2011**, 29, 8309-8316.

27. (a) Clavel, F.; Guetard, D.; Brun-Vezinet, F.; Chamaret, S.; Rey, M. A.; Santos-Ferreira, M. O.; Laurent, A. G.; Dauguet, C.; Katlama, C.; Rouzioux, C.; et al., Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **1986**, 233, 343-346; (b) Barin, F.; M'Boup, S.; Denis, F.; Kanki, P.; Allan, J. S.; Lee, T. H.; Essex, M., Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* **1985**, 2, 1387-1389.

28. Camarasa, M. J.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Gago, F., Dimerization inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, protease and integrase: a single mode of inhibition for the three HIV enzymes? *Antivir. Res.* **2006**, *71*, 260-267.
29. (a) Singh, I. P.; Chauthé, S. K., Small molecule HIV entry inhibitors: Part II. Attachment and fusion inhibitors: 2004-2010. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, *21*, 399-416; (b) Chantry, D., HIV entry and fusion inhibitors. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2004**, *9*, 1-7; (c) Jiang, S. B.; Zhao, Q.; Debnath, A. K., Peptide and non-peptide HIV fusion inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 563-580.
30. Lalezari, J. P.; Eron, J. J.; Carlson, M.; Cohen, C.; DeJesus, E.; Arduino, R. C.; Gallant, J. E.; Volberding, P.; Murphy, R. L.; Valentine, F.; Nelson, E. L.; Sista, P. R.; Dusek, A.; Kilby, J. M., A phase II clinical study of the long-term safety and antiviral activity of enfuvirtide-based antiretroviral therapy. *AIDS* **2003**, *17*, 691-698.
31. (a) Estebanez, M.; Arribas, J. R., Protease inhibitor monotherapy: what is its role? *Curr. HIV/AIDS Rep.* **2012**, *9*, 179-185; (b) Wlodawer, A.; Erickson, J. W., Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 543-585.
32. Cocohoba, J.; Dong, B. J., Raltegravir: The First HIV Integrase Inhibitor. *Clin. Ther.* **2008**, *30*, 1747-1765.
33. Hsiou, Y.; Ding, J.; Das, K.; Clark, A. D., Jr.; Hughes, S. H.; Arnold, E., Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure* **1996**, *4*, 853-860.
34. (a) Kohlstaedt, L. A.; Wang, J.; Friedman, J. M.; Rice, P. A.; Steitz, T. A., Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **1992**, *256*, 1783-1790; (b) Arnold, E.; Jacobo-Molina, A.; Nanni, R. G.; Williams, R. L.; Lu, X.; Ding, J.; Clark, A. D., Jr.; Zhang, A.; Ferris, A. L.; Clark, P.; et al., Structure of HIV-1 reverse transcriptase/DNA complex at 7 Å resolution showing active site locations. *Nature* **1992**, *357*, 85-89.
35. (a) Larder, B. A.; Purifoy, D. J.; Powell, K. L.; Darby, G., Site-specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature* **1987**, *327*, 716-717; (b) Ratner, L.; Haseltine, W.; Patarca, R.; Livak, K. J.; Starcich, B.; Josephs, S. F.; Doran, E. R.; Rafalski, J. A.; Whitehorn, E. A.; Baumeister, K.; Ivanoff, L.; Petteway, S. R.; Pearson, M. L.; Lautenberger,

J. A.; Papas, T. S.; Ghayeb, J.; Chang, N. T.; Gallo, R. C.; Wong-Staal, F., Complete nucleotide sequence of the AIDS virus. *Nature* **1985**, *313*, 277-284; (c) Pelletier, H.; Sawaya, M. R.; Kumar, A.; Wilson, S. H.; Kraut, J., Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science* **1994**, *264*, 1891-1903; (d) Steitz, T. A., DNA- and RNA-dependent DNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 31-38; (e) Jacobo-Molina, A.; Ding, J.; Nanni, R. G.; Clark, A. D., Jr.; Lu, X.; Tantillo, C.; Williams, R. L.; Kamer, G.; Ferris, A. L.; Clark, P.; et al., Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 6320-6324.

36. (a) Restle, T.; Muller, B.; Goody, R. S., RNase H activity of HIV reverse transcriptases is confined exclusively to the dimeric forms. *FEBS Lett.* **1992**, *300*, 97-100; (b) Müller, B.; Restle, T.; Weiss, S.; Gautel, M.; Sczakiel, G.; Goody, R. S., Co-expression of the subunits of the heterodimer of HIV-1 reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13975-13978; (c) Restle, T.; Müller, B.; Goody, R. S., Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8986-8988.

37. (a) Divita, G.; Rittinger, K.; Geourjon, C.; Deléage, G.; Goody, R. S., Dimerization Kinetics of HIV-1 and HIV-2 Reverse Transcriptase: A Two Step Process. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 508-521; (b) Divita, G.; Restle, T.; Goody, R. S., Characterization of the dimerization process of HIV-1 reverse transcriptase heterodimer using intrinsic protein fluorescence. *FEBS Lett.* **1993**, *324*, 153-158; (c) Venezia, C. F.; Meany, B. J.; Braz, V. A.; Barkley, M. D., Kinetics of association and dissociation of HIV-1 reverse transcriptase subunits. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9084-9093.

38. Cihlar, T.; Ray, A. S., Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antivir. Res.* **2010**, *85*, 39-58.

39. McLeod, G. X.; Hammer, S. M., Zidovudine: five years later. *Ann. Intern. Med.* **1992**, *117*, 487-501.

40. De Clercq, E., Clinical Potential of the Acyclic Nucleoside Phosphonates Cidofovir, Adefovir, and Tenofovir in Treatment of DNA Virus and Retrovirus Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 569-596.

41. Tuske, S.; Sarafianos, S. G.; Clark, A. D.; Ding, J.; Naeger, L. K.; White, K. L.; Miller, M. D.; Gibbs, C. S.; Boyer, P. L.; Clark, P.; Wang, G.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A.; Jerina, D. M.; Hughes, S. H.; Arnold, E., Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 469 - 474.
42. Martinez, S. E.; Bauman, J. D., HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 253-259.
43. Esnouf, R. M.; Ren, J.; Hopkins, A. L.; Ross, C. K.; Jones, E. Y.; Stammers, D. K.; Stuart, D. I., Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 3984-3989.
44. Ren, J.; Stammers, D. K., Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Virus Res.* **2008**, *134*, 157-170.
45. Lansdon, E. B.; Brendza, K. M.; Hung, M.; Wang, R.; Mukund, S.; Jin, D.; Birkus, G.; Kutty, N.; Liu, X., Crystal Structures of HIV-1 Reverse Transcriptase with Etravirine (TMC125) and Rilpivirine (TMC278): Implications for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4295-4299.
46. Hawkins, T., Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. *Antivir. Res.* **2010**, *85*, 201-209.
47. Dickinson, L.; Khoo, S.; Back, D., Pharmacokinetics and drug-drug interactions of antiretrovirals: an update. *Antivir. Res.* **2010**, *85*, 176-189.
48. (a) Becerra, S. P.; Kumar, A.; Lewis, M. S.; Widen, S. G.; Abbotts, J.; Karawya, E. M.; Hughes, S. H.; Shiloach, J.; Wilson, S. H., Protein-protein interactions of HIV-1 reverse transcriptase: implication of central and C-terminal regions in subunit binding. *Biochemistry* **1991**, *30*, 11707-11719; (b) Menéndez-Arias, L.; Betancor, G.; Matamoros, T., HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain mutations involved in resistance to approved non-nucleoside inhibitors. *Antivir. Res.* **2011**, *92*, 139-149.

49. (a) Kohlstaedt, L.; Wang, J.; Eriedman, J.; Rice, P.; Steitz, T., Crystal structural at 3.5 Å resolution of HIV-1 RT complexed with an inhibitor. *Science* **1992**, *256*, 1783 - 1790; (b) Wang, J.; Smerdon, S.; Jager, J.; Kohlstaedt, L.; Rice, P.; Friedman, J., Structural Basis of Asymmetry in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Heterodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 7242 - 7246.
50. (a) Baillon, J. G.; Nashed, N. T.; Kumar, A.; Wilson, S. H.; Jerina, D. M., A leucine zipper-like motif may mediate HIV reverse-transcriptase subunit binding. *New Biol.* **1991**, *3*, 1015-1019; (b) Tachedjian, G.; Aronson, H. E.; de los Santos, M.; Seehra, J.; McCoy, J. M.; Goff, S. P., Role of residues in the tryptophan repeat motif for HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 381-396; (c) Samanta, U.; Chakrabarti, P., Assessing the role of tryptophan residues in the binding site. *Protein Eng.* **2001**, *14*, 7-15.
51. Divita, G.; Restle, T.; Goody, R. S.; Chermann, J. C.; Baillon, J. G., Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimerization using synthetic peptides derived from the connection domain. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13080-13083.
52. Divita, G.; Baillon, J. G.; Rittinger, K.; Chermann, J.-C.; Goody, R. S., Interface Peptides as Structure-based Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 28642-28646.
53. Morris, M. C.; Robert-Hebmann, V.; Chaloin, L.; Mery, J.; Heitz, F.; Devaux, C.; Goody, R. S.; Divita, G., A New Potent HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24941-24946.
54. Morris, M. C.; Vidal, P.; Chaloin, L.; Heitz, F.; Divita, G., A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2730-2736.
55. Depollier, J.; Hourdou, M. L.; Aldrian-Herrada, G.; Rothwell, P.; Restle, T.; Divita, G., Insight into the mechanism of a peptide inhibitor of HIV reverse transcriptase dimerization. *Biochemistry* **2005**, *44*, 1909-1918.
56. Agopian, A.; Gros, E.; Aldrian-Herrada, G.; Bosquet, N.; Clayette, P.; Divita, G., A New Generation of Peptide-based Inhibitors Targeting HIV-1 Reverse Transcriptase Conformational Flexibility. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 254-264.

57. Grohmann, D.; Corradi, V.; Elbasyouny, M.; Baude, A.; Horenkamp, F.; Laufer, S. D.; Manetti, F.; Botta, M.; Restle, T., Small Molecule Inhibitors Targeting HIV-1 Reverse Transcriptase Dimerization. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 916-922.
58. (a) Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Camarasa, M. J.; Bathurst, I. C.; Barr, P. J.; De Clercq, E., Kinetics of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase by the novel HIV-1-specific nucleoside analogue [2',5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)thymine (TSAO-T). *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11831-11838; (b) Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E., [2',5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole -2'',2''-dioxide) (TSAO) derivatives of purine and pyrimidinenucleosides as potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 1073-1080; (c) Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E., 3'-Spiro nucleosides, a new class of specific human immunodeficiency virus type 1 inhibitors: synthesis and antiviral activity of [2'-5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-beta-D-xylo- and -ribofuranose]-3'-spiro-5''-[4''-amino-1'',2''-oxathiole 2'',2''-dioxide] (TSAO) pyrimidine nucleosides. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2721-2727; (d) Pérez-Pérez, M. J.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J., TSAO analogues. Stereospecific synthesis and anti-HIV-1 activity of 1-[2',5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole 2'',2''-dioxide) pyrimidine and pyrimidine-modified nucleosides. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2988-2995; (e) Camarasa, M. J.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Pérez-Pérez, M. J.; Gago, F.; Balzarini, J., TSAO compounds: the comprehensive story of a unique family of HIV-1 specific inhibitors of reverse transcriptase. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 945-963; (f) Camarasa, M. J.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Bonache, M. C.; De Castro, S., TSAO derivatives, inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase dimerization: recent progress. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 1895-1907.
59. Sluis-Cremer, N.; Dmitrienko, G. I.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Parniak, M. A., Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimer destabilization by 1-[Spiro[4''-amino-2'',2''-dioxo-1'',2''-oxathiole-5'',3'-[2', 5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]]]-3-ethylthymine. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1427-1433.
60. Álvarez, R.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Aquaro, S.; Declercq, E.; Perno, C. F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J., 1,2,3-Triazole-2',5'-bis-O-(tert-

butyldimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiol 2'',2''-dioxide) (TSAO) analogs -Synthesis and anti-HIV-1 activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4185-4194.

61. Jonckheere, H.; Taymans, J. M.; Balzarini, J.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J.; Desmyter, J.; De Clercq, E.; Anne, J., Resistance of HIV-1 reverse transcriptase against [2',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)] (TSAO) derivatives is determined by the mutation Glu138-->Lys on the p51 subunit. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25255-25258.

62. Rodríguez-Barrios, F.; Pérez, C.; Lobatón, E.; Velázquez, S.; Chamorro, C.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M. J.; Camarasa, M. J.; Pelemans, H.; Balzarini, J.; Gago, F., Identification of a putative binding site for [2',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)thymine (TSAO) derivatives at the p51-p66 interface of HIV-1 reverse transcriptase. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1853-1865.

63. Das, K.; Bauman, J. D.; Rim, A. S.; Dharia, C.; Clark, A. D.; Camarasa, M. a.-J.; Balzarini, J.; Arnold, E., Crystal Structure of tert-Butyldimethylsilyl-spiroaminooxathioledioxide-thymine (TSAO-T) in Complex with HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Redefines the Elastic Limits of the Non-nucleoside Inhibitor-Binding Pocket. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2727-2737.

64. Pandey, P.; Kaushik, N.; Talele, T.; Yadav, P.; Pandey, V., The beta7-beta8 loop of the p51 Subunit in the Heterodimeric (p66/p51) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase is Essential for the Catalytic Function of the p66 subunit. *Biochemistry* **2001**, *40*, 9505 - 9512.

65. (a) Balzarini, J.; Auwerx, J.; Rodríguez-Barrios, F.; Chedad, A.; Farkas, V.; Ceccherini-Silberstein, F.; García-Aparicio, C.; Velázquez, S.; De Clercq, E.; Perno, C. F.; Camarasa, M. J.; Gago, F., The amino acid Asn136 in HIV-1 reverse transcriptase (RT) maintains efficient association of both RT subunits and enables the rational design of novel RT inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 49-60; (b) Auwerx, J.; Van Nieuwenhove, J.; Rodríguez-Barrios, F.; de Castro, S.; Velázquez, S.; Ceccherini-Silberstein, F.; De Clercq, E.; Camarasa, M.-J.; Perno, C.-F.; Gago, F.; Balzarini, J., The N137 and P140 amino acids in the p51 and the P95 amino acid in the p66 subunit of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase are instrumental to maintain catalytic activity and to design

new classes of anti-HIV-1 drugs. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2294-2300; (c) Balzarini, J.; Karlsson, A.; Sardana, V. V.; Emini, E. A.; Camarasa, M. J.; De Clercq, E., Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-specific reverse transcriptase (RT) inhibitors may suppress the replication of specific drug-resistant (E138K)RT HIV-1 mutants or select for highly resistant (Y181C-->C181I)RT HIV-1 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 6599-6603.

66. (a) Pandey, P.; Kaushik, N.; Singh, K.; Sharma, B.; Upadhyay, A.; Kumar, S.; Harris, D.; Pandey, V., Insertion of a small peptide of six amino acids into the beta7-beta8 loop of the p51 subunit of HIV-1 reverse transcriptase perturbs the heterodimer and affects its activities. *BMC Biochem.* **2002**, *3*, 18; (b) Upadhyay, A.; Pandey, N.; Mishra, C. A.; Talele, T. T.; Pandey, V. N., A single deletion at position 134, 135, or 136 in the beta 7-beta 8 loop of the p51 subunit of HIV-1 RT disrupts the formation of heterodimeric enzyme. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *109*, 598-605; (c) Mulky, A.; Vu, B. C.; Conway, J. A.; Hughes, S. H.; Kappes, J. C., Analysis of amino acids in the beta7-beta8 loop of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase for their role in virus replication. *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 1368-1378; (d) Nissley, D. V.; Radzio, J.; Ambrose, Z.; Sheen, C. W.; Hamamouch, N.; Moore, K. L.; Tachedjian, G.; Sluis-Cremer, N., Characterization of novel non-nucleoside reverse transcriptase (RT) inhibitor resistance mutations at residues 132 and 135 in the 51 kDa subunit of HIV-1 RT. *Biochem. J.* **2007**, *404*, 151-157.

67. García-Aparicio, C. *Derivados TSAO: una herramienta útil para el estudio de un nuevo mecanismo de inhibición de la transcriptasa inversa del VIH-1 y de una nueva aproximación profármaco*. Tesis doctoral, **2006**. Universidad Complutense de Madrid.

68. Sluis-Cremer, N.; Hamamouch, N.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Balzarini, J.; Camarasa, M.-J., Structure-activity relationships of 2',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) thymine derivatives as inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4834-4841.

69. Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E. P.; Lambros, T. J.; Makofske, R. C.; Chang, C. D., Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35-42.

70. (a) Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749; (b) Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
71. Kates, S. A.; Albericio, F., Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide. *CRC Press* **2000**.
72. Han, S.-Y.; Kim, Y.-A., Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
73. Hood, C. A.; Fuentes, G.; Patel, H.; Page, K.; Menakuru, M.; Park, J. H., Fast conventional Fmoc solid-phase peptide synthesis with HCTU. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 97-101.
74. (a) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B., Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 147-157; (b) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
75. Chan, W. C.; White, P. D., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A practical Approach. *Oxford University Press* **2000**.
76. Kaul, R.; Surprenant, S.; Lubell, W. D., Systematic Study of the Synthesis of Macrocyclic Dipeptide β -Turn Mimics Possessing 8-, 9-, and 10- Membered Rings by Ring-Closing Metathesis. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3838-3844.
77. Rush, J.; Bertozzi, C. R., An alpha-formylglycine building block for Fmoc-based solid-phase peptide synthesis. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 131-134.
78. Rodriguez, A.; Miller, D. D.; Jackson, R. F. W., Combined application of organozinc chemistry and one-pot hydroboration-Suzuki coupling to the synthesis of amino acids. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 973-977.
79. Pascal, R.; Sola, R., Preservation of the protective group under alkaline conditions by using CaCl₂. Applications in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5031-5034.

80. (a) Grubbs, R. H.; Miller, S. J.; Fu, G. C., Ring-Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 446-452; (b) Miller, S. J.; Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H., Application of ring-closing metathesis to the synthesis of rigidified amino acids and peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9606-9614.
81. Grubbs, R. H., Olefin metathesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7117-7140.
82. Trnka, T. M.; Grubbs, R. H., The development of $L(2)X(2)Ru = CHR$ olefin metathesis catalysts: An organometallic success story. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18-29.
83. Por ejemplo, Aldrich dispone en su catálogo de los cuatro catalizadores, así como otros derivados.
84. Huang, J.; Stevens, E. D.; Nolan, S. P.; Petersen, J. L., Olefin Metathesis-Active Ruthenium Complexes Bearing a Nucleophilic Carbene Ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2674-2678.
85. Hoveyda, A. H.; Gillingham, D. G.; Van Veldhuizen, J. J.; Kataoka, O.; Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Harrity, J. P. A., Ru complexes bearing bidentate carbenes: from innocent curiosity to uniquely effective catalysts for olefin metathesis. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 8-23.
86. (a) Armstrong, S. K., Ring closing diene metathesis in organic synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 371-388; (b) Grubbs, R. H.; Chang, S., Recent advances in olefin metathesis and its application in organic synthesis. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413-4450.
87. (a) Blackwell, H. E.; Sadowsky, J. D.; Howard, R. J.; Sampson, J. N.; Chao, J. A.; Steinmetz, W. E.; O'Leary, D. J.; Grubbs, R. H., Ring-closing metathesis of olefinic peptides: Design, synthesis, and structural characterization of macrocyclic helical peptides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5291-5302; (b) Brik, A., Metathesis in peptides and peptidomimetics. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1661-1675; (c) Lambert, J. N. M., J.P.; Roberts, K.D., The synthesis of cyclic peptides. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **2001**, 471-484.
88. Jacobsen, O.; Klaveness, J.; Rongved, P., Structural and pharmacological effects of ring-closing metathesis in peptides. *Molecules* **2010**, *15*, 6638-6677.

89. Miles, S. M.; Leatherbarrow, R. J.; Marsden, S. P.; Coates, W. J., Synthesis and bio-assay of RCM-derived Bowman-Birk inhibitor analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 281-283.
90. El catalizador en DCM y la resina en suspensión adquiere un color anaranjado. Tras llevar a cabo la reacción de RCM en microondas, el color cambia a verde aceituna.
91. Robinson, A. J.; Elaridi, J.; Van Lierop, B. J.; Mujcinovic, S.; Jackson, W. R., Microwave-assisted RCM for the synthesis of carbocyclic peptides. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 280-285.
92. Chapman, R. N.; Arora, P. S., Optimized synthesis of hydrogen-bond surrogate helices: surprising effects of microwave heating on the activity of Grubbs catalysts. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5825-5828.
93. Illesinghe, J.; Gou, C. X.; Garland, R.; Ahmed, A.; van Lierop, B.; Elaridi, J.; Jackson, R. F. W.; Robert, A., Metathesis assisted of cyclic peptides. *Chem. Commun.* **2009**, *3*, 295-297.
94. (a) Ahn, Y. M.; Yang, K.; Georg, G. I., A convenient method for the efficient removal of ruthenium byproducts generated during olefin metathesis reactions. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1411-1413; (b) Maynard, H. D.; Grubbs, R. H., Purification technique for the removal of ruthenium from olefin metathesis reaction products. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4137-4140; (c) Paquette, L. A.; Schloss, J. D.; Efremov, I. I.; Fabris, F.; Gallou, F.; Mendez-Andino, J.; Yang, J., A convenient method for removing all highly-colored byproducts generated during olefin metathesis reactions. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1259-1261.
95. (a) Stymiest, J. L.; Mitchell, B. F.; Wong, S.; Vederas, J. C., Synthesis of biologically active dicarba analogues of the peptide hormone oxytocin using ring-closing metathesis. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 47-49; (b) Stymiest, J. L.; Mitchell, B. F.; Wong, S.; Vederas, J. C., Synthesis of Oxytocin Analogues with Replacement of Sulfur by Carbon Gives Potent Antagonists with Increased Stability. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7799-7809.
96. Rijkers, D. T. S.; van Vugt, H. H. R.; Jacobs, H. J. F.; Liskamp, R. M. J., A convenient synthesis of azido peptides by post-assembly diazo transfer on the solid phase applicable to large peptides. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3657-3660.

97. Weerapana, E.; Speers, A. E.; Cravatt, B. F., Tandem orthogonal proteolysis-activity-based protein profiling (TOP-ABPP)—a general method for mapping sites of probe modification in proteomes. *Nat. Protocols* **2007**, 2, 1414-1425.
98. Roice, M.; Johannsen, I.; Meldal, M., High Capacity Poly(ethylene glycol) Based Amino Polymers for Peptide and Organic Synthesis. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, 23, 662-673.
99. Titz, A.; Radic, Z.; Schwardt, O.; Ernst, B., A safe and convenient method for the preparation of triflyl azide, and its use in diazo transfer reactions to primary amines. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 2383-2385.
100. (a) Huisgen, L., Proceedings of the Chemical Society. October 1961. *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357-396; (b) Huisgen, R., Kinetik und Mechanismus 1,3-Dipolarer Cycloadditionen. *Angew. Chem.* **1963**, 75, 742-754; (c) Huisgen, R., 1,3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick. *Angew. Chem.* **1963**, 75, 604-637.
101. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: 1,2,3 - triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
102. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
103. Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952-3015.
104. (a) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., Cu-I-catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 51-68; (b) Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952-3015; (c) Wu, P.; Fokin, V. V., Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. *Aldrichim. Acta* **2007**, 40, 7.
105. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.

106. Moses, J. E.; Moorhouse, A. D., The growing applications of click chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262.
107. Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H. T.; Lin, Z. Y.; Jia, G. C.; Fokin, V. V., Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: Scope and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923-8930.
108. (a) Angell, Y. L.; Burgess, K., Peptidomimetics via copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1674-1689; (b) Holub, J. M.; Kirshenbaum, K., Tricks with clicks: modification of peptidomimetic oligomers via copper-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1325-1337; (c) Pedersen, D. S.; Abell, A., 1,2,3-Triazoles in Peptidomimetic Chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 2399-2411; (d) Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A., Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278-308.
109. (a) Best, M., Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571-6584; (b) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R., Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272-1279.
110. (a) Empting, M.; Avrutina, O.; Meusinger, R.; Fabritz, S.; Reinwarth, M.; Biesalski, M.; Voigt, S.; Buntkowsky, G.; Kolmar, H., "Triazole Bridge": Disulfide-Bond Replacement by Ruthenium-Catalyzed Formation of 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5207-5211; (b) Holland-Nell, K.; Meldal, M., Maintaining Biological Activity by Using Triazoles as Disulfide Bond Mimetics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5204-5206.
111. (a) Beierle, J. M.; Horne, W. S.; van Maarseveen, J. H.; Waser, B.; Reubi, J. C.; Ghadiri, M. R., Conformationally Homogeneous Heterocyclic Pseudotetrapeptides as Three-Dimensional Scaffolds for Rational Drug Design: Receptor-Selective Somatostatin Analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4725-4729; (b) Oh, K.; Guan, Z., A convergent synthesis of new [small beta]-turn mimics by click chemistry. *Chem. Commun.* **2006**, *7*, 3069-3071.
112. Goncalves, V.; Gautier, B.; Regazzetti, A.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N., On-resin cyclization of peptide ligands of the Vascular Endothelial

Growth Factor Receptor 1 by copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5590-5594.

113. (a) Jagasia, R.; Holub, J. M.; Bollinger, M.; Kirshenbaum, K.; Finn, M. G., Peptide Cyclization and Cyclodimerization by CuI-Mediated Azide-Alkyne Cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2964-2974; (b) Punna, S.; Kuzelka, J.; Wang, Q.; Finn, M. G., Head-to-tail peptide cyclodimerization by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2215-2220.

114. Zhang, Z.; Fan, E., Solid phase synthesis of peptidotriazoles with multiple cycles of triazole formation. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 665-669.

115. (a) Albericio, F., Orthogonal protecting groups for N(alpha)-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers* **2000**, *55*, 123-139; (b) Loffet, A.; Zhang, H. X., Allyl-based groups for side-chain protection of amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 346-351; (c) Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibe, F.; Albericio, F., Use of Alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7275-7278.

116. Albericio, F.; Carpino, L. A., Coupling reagents and activation. *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 104-126.

117. Gómez-Moreno Calera, C.; Sáncho Sanz, J., *Estructura de proteínas*. Ariel ciencia: Barcelona, 2003.

118. Como ejemplo se señala el discurso que pronunció el Prof. Wüthrich en 2002, cuando recogió el Premio Nobel en Química. URL: www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/wutrich-lecture.pdf

119. URL: www.cyana.org. Grupo del Prof. Peter Güntert. Goethe-Universität Frankfurt am Main.

120. (a) Wüthrich, K.; Billeter, M.; Braun, W., Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 715-740; (b) Wüthrich, K., NMR of proteins and nucleic acids. Wiley & Sons, Inc.: New York, 1986.

121. Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Holm, A.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D., ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67-81.
122. (a) Kopple, K. D.; Ohnishi, M., Conformations of cyclic peptides. II. Side-chain conformation and ring shape in cyclic dipeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 962-975; (b) Ohnishi, M.; Urry, D. W., Temperature dependence of amide proton chemical shifts: the secondary structures of gramicidin S and valinomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *36*, 194-202.
123. (a) Madison, V.; Kopple, K. D., Solvent-dependent conformational distributions of some dipeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4855-4863; (b) Belvisi, L.; Gennari, C.; Mielgo, A.; Potenza, D.; Scolastico, C., Conformational preferences of peptides containing reverse-turn mimetic bicyclic lactams: inverse γ -turns versus type II' β -turns-insights into β -hairpin stability. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 389-400.
124. Günter, P. The CYANA Wiki. <http://www.cyana.org>.
125. Maiorov, V. N.; Crippen, G. M., Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 625-634.
126. Cornilescu, G.; Delaglio, F.; Bax, A., Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR in Biomedicine* **1999**, *13*, 289-302.
127. Shen, Y.; Delaglio, F.; Cornilescu, G.; Bax, A., TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts *J. Biomol. NMR* **2009**, *44*, 213-223.
128. Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V., Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 95-99.

Inhibidores de la dimerización de la TryR de *Leishmania infantum*

2.1. Introducción

El término *leishmaniasis* hace referencia a una enfermedad parasitaria en mamíferos, de gran diversidad clínica y epidemiológica que se transmite por la picadura de más de 30 especies de dípteros de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*¹. Su agente etiológico es un parásito protozoario del orden de los tripanosomátidos perteneciente al género *Leishmania*² del que se han descrito más de 20 especies. Estos insectos se encuentran en todas las zonas tropicales del planeta, siendo en Asia y América del Sur donde se describen la mayoría de los casos de leishmaniasis. Sin embargo, aunque históricamente la leishmaniasis ha quedado limitada a los países cercanos al trópico, en los últimos años esta enfermedad es considerada una zoonosis emergente en el mundo desarrollado³, donde la co-infección con el VIH se está convirtiendo en una siniestra tendencia global. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que hoy en

día hay cerca de doce millones de infectados por *Leishmania*, y que en el último año se han registrado dos millones de nuevos casos entre adultos y niños².

La enfermedad presenta hasta cuatro posibles cuadros clínicos⁴. La leishmaniasis visceral (LV), la manifestación más severa, ataca a los órganos internos, principalmente hígado y bazo. Los pacientes que padecen LV sufren de fiebre irregular, pérdida de peso, y si no es tratada a tiempo, puede causar el fallecimiento del paciente. Además, tras el tratamiento es posible la recaída en LV crónica. La otra variante más común de la enfermedad es conocida como leishmaniasis cutánea (LC) ya que produce úlceras en cara y extremidades.

2.1.1. Ciclo vital de *Leishmania*

El ciclo de vida del parásito *Leishmania* es complejo, y en él se pueden diferenciar claramente dos fases: una etapa extracelular dentro de un huésped invertebrado (flebótomo) y una intracelular dentro del huésped vertebrado (Figura 2.1). Además, y dependiendo de su entorno, el parásito presenta principalmente dos morfologías, amastigote (en el huésped vertebrado) y promastigote (en el invertebrado).

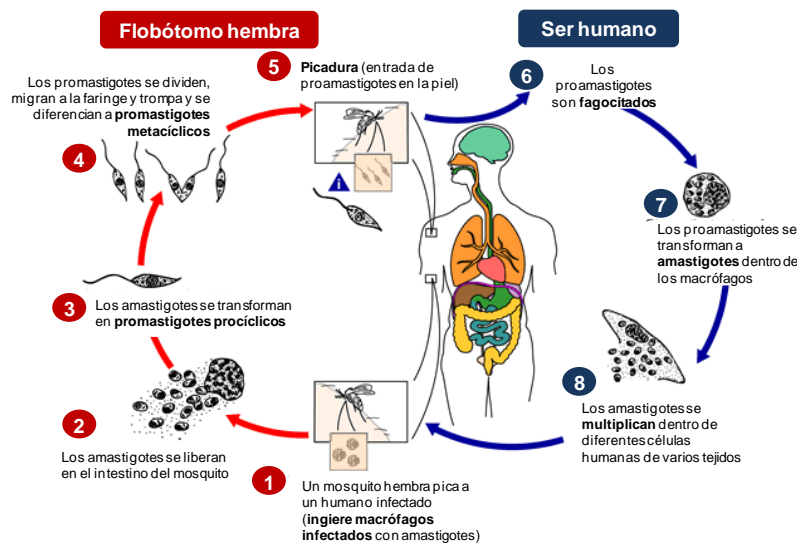


Figura 2.1 | Ciclo vital de *Leishmania* (figura adaptada de la r

Todo comienza cuando una hembra de flebótomo pica a un huésped vertebrado infectado (paso 1). Mientras ingiere sangre del mamífero, alimento que le dará el aporte proteico para su puesta de huevos, el parásito entra a través de su trompa al insecto (paso 2). Una vez ya dentro del nuevo vector de transmisión, el protozoo se desarrolla como *promastigote*⁶ (pasos 3 y 4), de morfología alargada y motilidad propia gracias a la presencia de un flagelo. Una vez que un flebótomo hembra pica a mamífero vertebrado (paso 5), comienza la segunda fase del ciclo vital del parásito (paso 6). En este punto, los protozoos se diferencian a la forma de *amastigotes*⁷, donde presentan una morfología de ovoides y carecen de flagelo externo. Ésta es la forma infectiva de la *Leishmania*. La activación de los *promastigotes* se produce como consecuencia del proceso de entrada en el organismo huésped: nada más entrar el parásito en el organismo vertebrado, estos protozoos son fagocitados por células del sistema inmune, quedando finalmente en el interior de los lisosomas de los macrófagos⁸ (paso 7). Es dentro de éstos donde se transforman a *amastigotes* y se dividen por fisión binaria, acumulándose en el *fagolisosoma* (lisosoma del macrófago donde se han acumulado los amastigotes fagocitados) hasta el momento en el ocurre la lisis celular (paso 8). Finalmente, la liberación de nuevos parásitos al plasma lleva a la infección de las células vecinas. El ciclo vital del parásito se completa en el momento que un flebótomo se alimenta de la sangre de este vertebrado infectado (paso 1).

2.1.2. Tratamiento actual de la leishmaniasis

Hoy en día no se dispone de ninguna vacuna frente a la *Leishmania* en humanos. Asimismo, el tratamiento actual recae exclusivamente en el uso de fármacos⁹ (Figura 2.2). La primera generación de fármacos la constituyen los derivados antimoniales pentavalentes, fármacos ampliamente empleados en países como India, donde la infección es endémica¹⁰. Dentro de esta familia se encuentran el *estibogluconato de sodio* (1) y el *antimoniato de meglumina* (2). Su administración es por vía parental y se requiere tratamientos prolongados (hasta 30 días), lo que hace que estos fármacos sean altamente costosos. Además, junto con la aparición de cepas resistentes a estos fármacos¹⁰, los derivados de

antimonio presentan problemas de toxicidad cardíaca, llegando a morir hasta el 6% de los pacientes a causa del tratamiento.

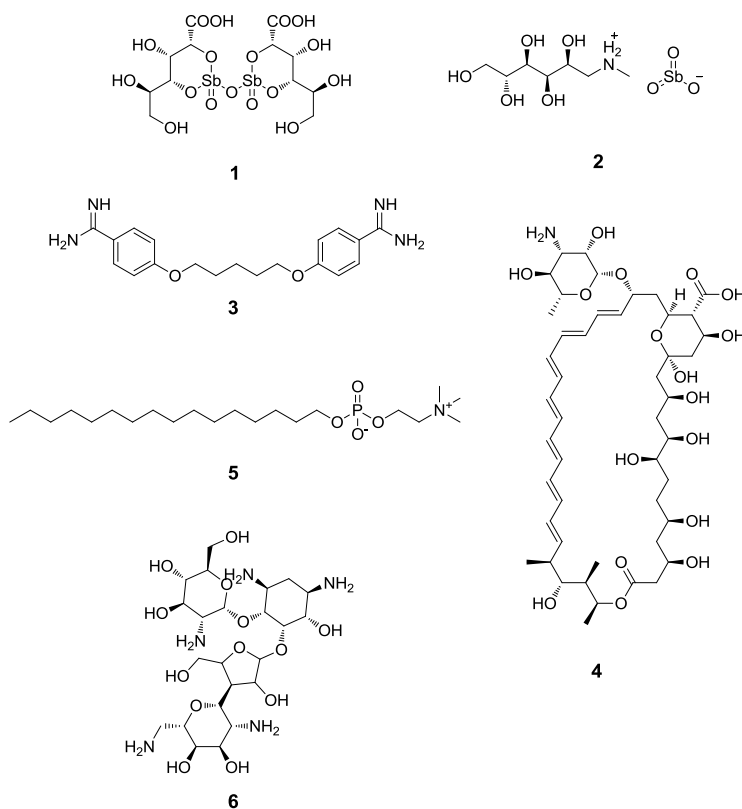


Figura 2.2 | Fármacos aprobados para el tratamiento de la leishmaniasis.

La pentamidina¹¹ (3) y el antibiótico anfotericina B¹² (4) se han empleado desde la segunda mitad del siglo pasado en aquellos casos en los que los antimoniales pentavalentes no resultaban efectivos. Sin embargo, y al igual que en el caso de los fármacos de primera generación, las toxicidades asociadas a estos tratamientos hacen necesaria la hospitalización de los pacientes. Más recientemente se ha desarrollado una formulación en liposomas de la anfotericina B que permite una mejora en su posología¹³. La miltefosina¹⁴ (5), inicialmente desarrollada como un anticanceroso, es el último fármaco aprobado para el tratamiento de la leishmaniasis. Registrado en 2002 en India, ha constituido un

gran avance ya que se trata del primero de los fármacos que puede ser suministrado de forma oral. Sin embargo, tiene altos costes de producción y presenta efectos teratogénicos. Asimismo, ya se han descrito cepas resistentes a este fármaco por algunos laboratorios. Por último, cabe destacar la paromomicina¹⁵ (6), un antibiótico aminoglicosilado de amplio espectro, incluyendo bacterias, protozoos y hemintos. Es un medicamento huérfano que desde 2005 se utiliza para el tratamiento de la LV, en distintas combinaciones con antimoniales.

Por último, la terapia combinada de los fármacos disponibles y descritos anteriormente, está permitiendo retrasar el desarrollo de resistencias, aumentar la actividad antiparasitaria, disminuir la dosis y duración del tratamiento.

Todos estos factores ponen de manifiesto que el arsenal farmacológico disponible hoy en día para el tratamiento de la Leishmaniasis es limitado, y como poco, insatisfactorio¹⁶. Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevos fármacos, más potentes, con menores efectos secundarios, que superen el problema de resistencias y de menor coste.

2.1.3. El metabolismo redox como un elemento clave en la supervivencia de *Leishmania*

Debido a su naturaleza, a lo largo de su ciclo vital el parásito se encuentra sometido a condiciones de estrés oxidativo. Es por ello que la familia de los tripanosomátidos (familia a la que pertenece el subgénero de *Leishmania*) han desarrollado a lo largo de la evolución un sistema regulador de su metabolismo redox potente y único, que se diferencia claramente del usado por la gran mayoría de procariotas y eucariotas¹⁷. Mientras que el resto de los organismos cuentan con un sistema homólogo desde el punto de vista funcional basado en la molécula glutatión (7) y en la enzima glutatión reductasa (GR), estos parásitos dependen de forma exclusiva del par formado por tripanotión y tripanotión reductasa (TryR) (Figura 2.3). El tripanotión se forma por la condensación de dos moléculas de glutatión (péptido) y una de espermidina (poliamina). Constituye el principal poder reductor del parásito y en su biosíntesis es un proceso complejo en el que

intervienen al menos seis enzimas¹⁶. La molécula de tripanotión se encuentra en su forma reducida (T(SH)₂) por acción de la TryR, lo que permite al parásito almacenar en forma de tripanotión su poder reductor. Se ha descrito que el papel de esta molécula es clave en procesos de biosíntesis de desoxirribonucleótidos¹⁸, o en la detoxificación de hidroperóxidos¹⁹ y otros radicales que se generan en un ambiente de estrés oxidativo, donde aporta equivalentes de reducción.

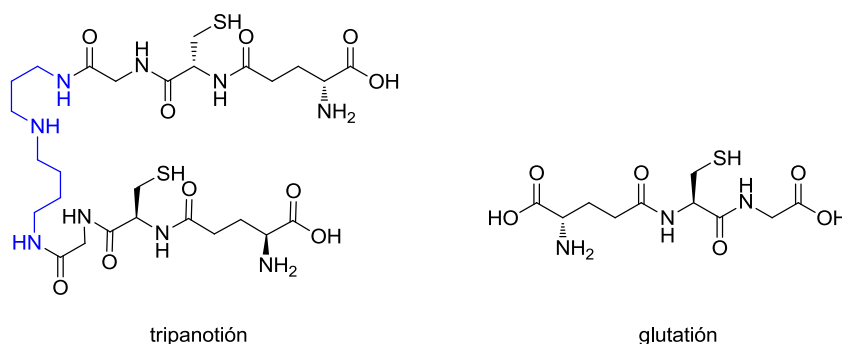


Figura 2.3 | Tripanotión y glutatión, sustratos de las enzimas TryR y GR, respectivamente. La molécula de espermidina aparece marcada en azul.

La TryR pertenece a la familia de las oxidorreductasas¹⁷ (EC 1.8.1.12). Utiliza el flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor y el NADPH como donador de poder reductor. Presenta un 30% de homología de secuencia y un alto grado de similitud estructural con la GR²⁰. Sin embargo, aunque estas dos enzimas son similares desde el punto de vista catalítico, poseen especificidades de sustrato mutuamente exclusivas²¹: mientras que la TryR reduce al TS₂ (molécula con carga neta positiva), la GR no lo reconoce como sustrato, reduciendo selectivamente al glutatión (molécula cargada negativamente). Este hecho podría explicarse en base a las diferencias de densidad electrónica del sitio activo de las dos enzimas.

En los años 1991 y 1994 se cristalizaron y determinaron las primeras estructuras de la TryR de las dos especies de tripanosomátidos *C. fasciculata* y *T. cruzi*²², respectivamente. Más recientemente, en el año 2009, se ha resuelto la estructura de TryR de una tercera especie, la correspondiente a *L. infantum*²³.

Todas estas proteínas se encuentran en forma de homodímero en condiciones nativas, estando cada subunidad formada por tres dominios: uno de unión a FAD, otro de unión a NADPH y el tercero correspondiente al dominio de dimerización (Figura 2.4).

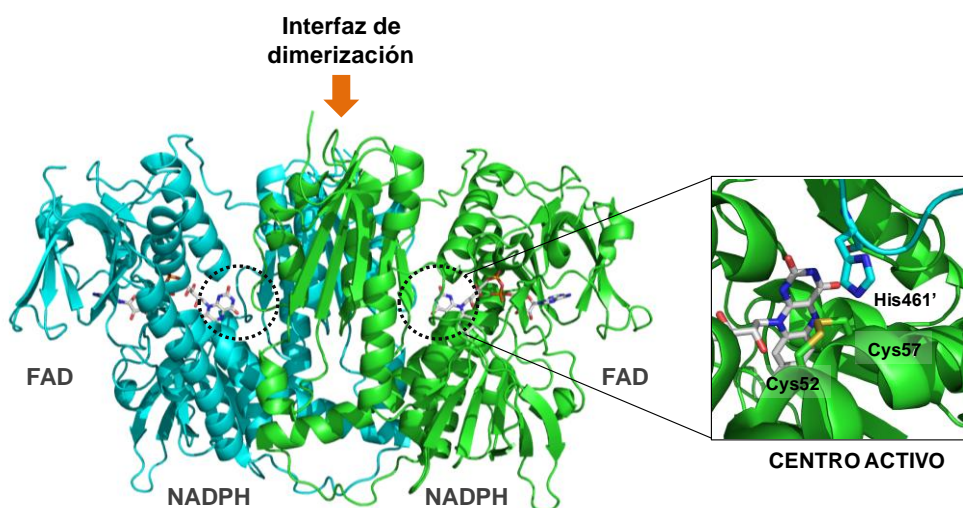


Figura 2.4 | Estructura cuaternaria y dominios funcionales de la Li-TryR (código PDB: 2jk6).

En el caso de la TryR de *L. infantum* (Li-TryR), cada uno de los monómeros tiene un peso de 53 KDa y el homodímero presenta un eje de simetría de tipo C_2 entre las dos subunidades²³. El sitio activo de la enzima está constituido por dos residuos de cisteína (Cys52 y Cys57), los cuales en su forma oxidada, se encuentran formando un enlace disulfuro. Según el modelo catalítico propuesto para la enzima análoga de *P. falciparum*²⁴, todo comienza con la reducción de esta unidad de cistina (Cys52-Cys57) del sitio activo por un equivalente de reducción proveniente del NADPH, mediante ataque nucleofílico del azufre de la Cys57 sobre el anillo de flavina del FAD, formándose un complejo estable de transferencia de carga entre el FAD y la Cys57 (Figura 2.5). A continuación, tras disociarse la molécula oxidada de NADP⁺ y la entrada de una nueva molécula de NADPH, el tiol de la Cys52, el cual se encuentra activado por el par His461' y Glu466', ataca al átomo de azufre del T(S)₂, formándose un disulfuro mixto

enzima-sustrato. Por último, el ataque nucleofílico de la Cys57 sobre la Cys52 regenera el enlace de disulfuro del centro activo, liberando una molécula de $T(SH)_2$.

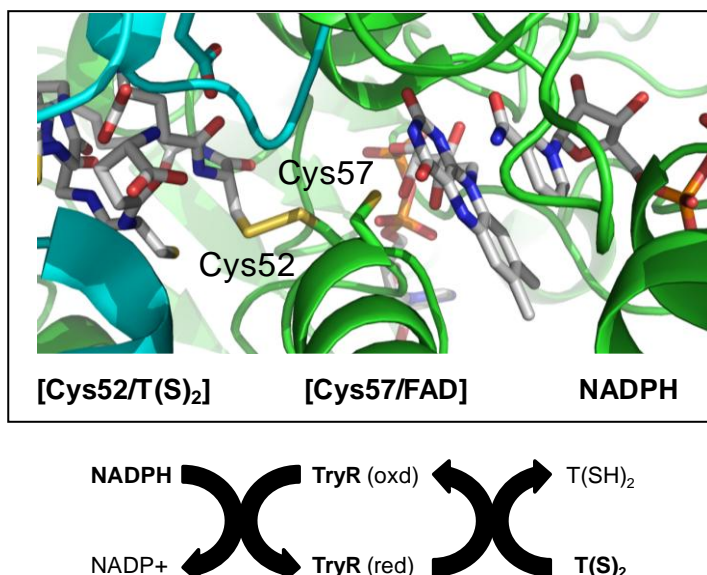


Figura 2.5 | Intermedios de $[Cys52/T(S)_2]$ y $[Cys57/FAD]$ formados durante el mecanismo catalítico propuesto. Debajo se indica la cascada de electrones desde el NADPH hasta el tripanotión reducido. $T(S)_2$ = tripanotión oxidado; $T(SH)_2$ = tripanotión reducido.

2.1.4. Inhibidores de la TryR

Distintas aproximaciones farmacológicas han validado a la TryR como diana terapéutica de gran interés en la búsqueda de inhibidores^{16, 25}. Por un lado, se ha demostrado que la TryR es una enzima esencial para la supervivencia de los tripanosomátidos²⁶. En ausencia de la TryR los parásitos pierden por completo su poder infectivo así como su parasitemia. Por otro lado, el hecho de que esta enzima no esté presente en humanos, hace que su inhibición sea un punto de ataque selectivo frente al parásito.

Aunque no surgieron a partir de un diseño racional, hoy en día se conoce que los antimoniales pentavalentes, fármacos clásicos para el tratamiento de la

leishmaniasis inciden directamente sobre el centro activo de la enzima, “capturando” los tioles de las cisteínas 52 y 57, lo que lleva al colapso metabólico de los parásitos, y finalmente, a su muerte²³. Recientemente se ha descrito un papel análogo para especies catiónicas de Ag²⁷ y Au²⁸.

La mayoría de los esfuerzos en el desarrollo de nuevos inhibidores de la enzima se han basado en el diseño de moléculas dirigidas al centro activo de la enzima^{16, 29}. Como tendencia general de los inhibidores de la TryR, se ha observado que los más efectivos suelen tener un carácter lipófilo y poseen al menos una amina. Sin embargo, el gran tamaño de esta región de la enzima, su distribución de cargas así como su forma abierta dificulta el diseño racional basado en la estructura de la enzima. Tanto es así, que aunque en la pasada década se han descrito numerosas moléculas que son capaces de inhibir a la enzima con una potencia moderada, a día de hoy no se dispone de una clara evidencia del modo de unión de estos inhibidores a la enzima, con dos excepciones: la mepacrina³⁰ (**7**) y unos derivados de 3,4-dihidroquinozalina³¹ (**8**) (Figura 2.6), los cuales se han conseguido co-cristalizar con la enzima³². En la Figura 2.6 se muestran las estructuras de **7** y **8** así como el detalle de las complejos co-cristalizados comentados anteriormente. La mepacrina (**7**) fue el primer compuesto tricíclico identificado como un inhibidor competitivo de la TryR, selectivo que no inhibe la GR humana. El anillo de acridina de **7** se fija en el sitio activo, en una región hidrofóba delimitada por los residuos Trp21 y Met113, interaccionando con la cadena lateral del Glu18 a través de su alquilamino. En la estructura cristalizada de TryR de *T.cruzi* con la mostaza de la mepacrina, se se unen dos moléculas de mepacrina en el centro activo de la enzima.

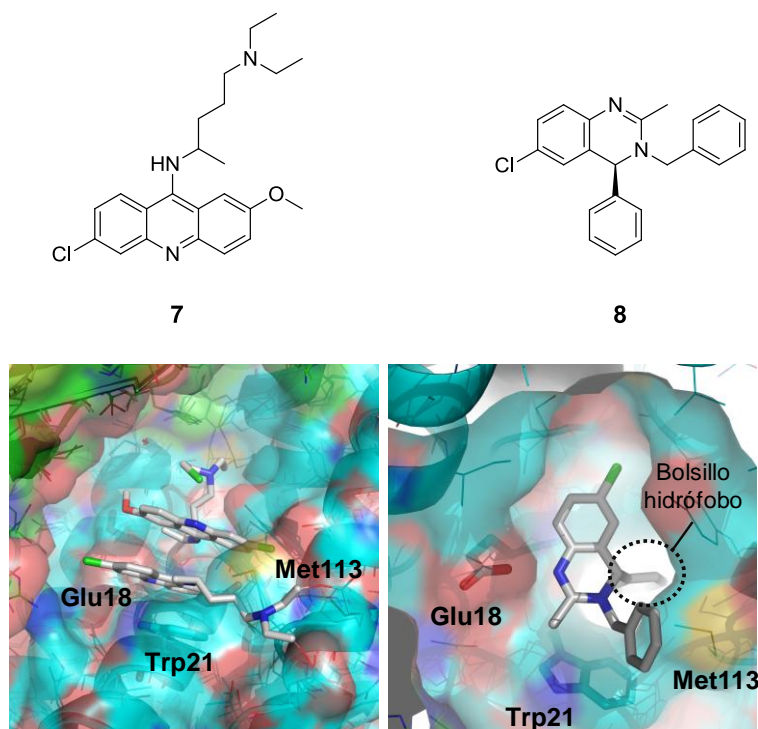


Figura 2.6 | Estructuras de mepacrina (**7**) y la (4S)-3-bencil-6-cloro-2-metil-4-fenil-3,4-dihidroquinizalina (**8**) y estructuras cristalinas de estos inhibidores con la TryR de *T. cruzi*.

En el caso de los complejos cristalinos resueltos para las 3,4-dihidroquinazolininas en complejo con la TryR de *T. cruzi* (se muestra como ejemplo **8**), se observa que sólo en presencia del inhibidor se genera un pequeño bolsillo hidrofóbico en el mismo sitio donde se unía **7** para acomodar al grupo arilo presente en **8**.

Estos datos experimentales han llevado a proponer dos puntos de interacción de los distintos inhibidores de la TryR dirigidos en el sitio activo basado en dos zonas. La primera región sería aquella donde interacciona el anillo tricíclico de la mepacrina (**7**) o los derivados de 3,4-dihidroquinizalina (como **8**), en la que se anclan los residuos cargados positivamente a través del Glu18. La segunda zona, estaría en el entorno de los residuos hidrofóbicos Leu393, Phe396 y Leu399,

residuos que dan entrada a la cavidad que queda en la interfaz de dimerización de la TryR. Es en esta segunda región donde interaccionan los dos grupos amino del tripanotión (sustrato) con las cadenas laterales del otro monómero Glu466' y Glu467'. Sin embargo, en los distintos programas de búsqueda de nuevos inhibidores y en estudios de relaciones estructura-actividad (SAR) llevados a cabo hasta el momento, y en los que se ha utilizado este modelo de interacción en el diseño, no se han observado incrementos destacados en la potencia de los fármacos, y lo que es más llamativo, dentro de compuestos de una misma serie química, se observan comportamientos inhibitorios dispares (competitivo, no competitivo y mixto).

Debido a la dificultad en el diseño de inhibidores de la enzima basados en la proteína, más recientemente se han llevado a cabo diferentes programas de cribado de alto rendimiento (HTS) así como de cribados virtuales de quimiotecas diversas frente a la enzima³³. Como resultado, se han identificado moléculas con perfiles de inhibición moderados (en el rango sub-micromolar), y que de nuevo presentan mecanismos de inhibición dispares para derivados químicos de una misma serie.

2.2. Antecedentes

Según lo mencionado en la introducción se pone de manifiesto la complejidad en el diseño de inhibidores de la TryR, y la necesidad de búsqueda de nuevas aproximaciones para su diseño. Debido a que la especie biológicamente relevante de la TryR es un homodímero, se podría proponer la perturbación de las interacciones proteína-proteína de la interfaz de dimerización que constituyen el complejo como un nuevo mecanismo de inhibición de la enzima. En este sentido, se ha descrito un ejemplo similar para la inhibición de la GR (enzima análoga en humanos) así como frente a la GR de *P. falciparum*^{16, 34} (Pf-GR). En estos estudios los autores describen que, péptidos derivados de la interfaz proteína-proteína, son capaces de perturbar no sólo la constitución de los homodímeros de GR y Pf-GR, sino también sus actividades enzimáticas. Estos datos validan y apoyan nuestra propuesta de la interfaz de dimerización de esta familia de oxidoreductasas como un punto de partida para el desarrollo de inhibidores de IPPs.

2.2.1. Predicción de hot spots de la interfaz de dimerización de la Li-TryR

En nuestro grupo de investigación y grupos colaboradores se propuso llevar a cabo un estudio de la interfaz de dimerización de la TryR de *L. infantum* (Li-TryR) con el fin de desarrollar moléculas capaces de perturbar al homodímero. Sin embargo, al comienzo de la presente Tesis, la estructura de la enzima no había conseguido resolverse. Por ello, y como un primer paso para la predicción de la presencia de *hot spots* en la interfaz de dimerización de la enzima, el grupo del Prof. Federico Gago (Universidad de Alcalá), llevó a cabo la construcción de un modelo por homología para la Li-TryR partiendo de la estructura cristalina de la TryR de *C. fasciculata*, con la que esta enzima presenta un 79% de similitud de secuencia (código PDB 1FEC). A continuación, se determinaron las contribuciones energéticas individuales (de tipo electrostática y de van der Waals) así como la superficie accesible al disolvente (SASA) de cada residuo de la interfaz de dimerización de la Li-TryR. Estos parámetros dan cuenta de la relevancia de cada residuo para la estabilidad global del dímero. De entre todos los aminoácidos,

destacaron tres residuos que eran relevantes en dos de los tres parámetros evaluados: Trp81, Glu436 y Gln439³⁵ (Figura 2.7).

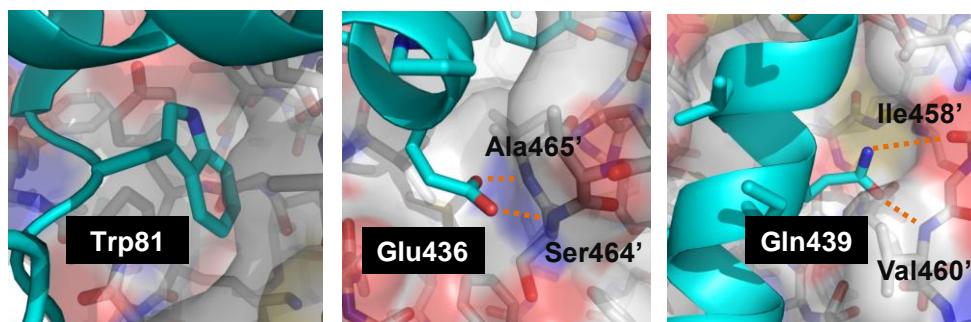


Figura 2.7 | Potenciales *hot spots* identificados en la interfaz de dimerización de la Li-TryR.

El Trp81 se encuentra enterrado en un bolsillo hidrofóbico definido por los residuos Tyr69', Met70', Ile73', Leu88', Pro90', Gly209' y Tyr210' del otro monómero y que forma parte del dominio de unión a FAD. En cambio, el Glu436 y la Gln439 se encuentran situados en una hélice α (de secuencia Pro435-Met447), situada en la interfaz de dimerización. Ambos establecen interacciones de tipo electrostático con el esqueleto peptídico de Ser464' y Ala465', y con el de Ile458' y Val460', respectivamente.

Con el fin de validar los tres residuos anteriores como verdaderos *hot spots* para el proceso de dimerización de la TryR, el equipo del Prof. Antonio Jiménez (Universidad de Alcalá) expresó las enzimas mutantes Trp81Ala, Glu436Ala y Gln439Ala mediante mutagénesis dirigida³⁵. En primer lugar, determinaron los porcentajes de especies monomérica y dimérica tanto de la enzima salvaje como de los mutantes anteriores de TryR, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas así como mediante ultracentrifugación analítica. Ambos ensayos pusieron de manifiesto que la enzima salvaje se encuentra casi exclusivamente en su forma dimérica, ya que ninguna banda correspondiente al monómero fue detectada en PAGE y sólo un 4% de la proteína sedimentó como monómero en ultracentrifugación analítica. Resultados similares se obtuvieron para los mutantes Trp81Ala y Gln439Ala. Sin embargo, en

el caso de la enzima mutada Glu436Ala, se observó claramente una banda correspondiente al monómero en PAGE, resultado corroborado mediante una detección de un 22% de especie monomérica en los experimentos de velocidad de sedimentación.

De forma complementaria realizaron también un estudio de unión de flavín adenín dinucleótido (FAD) a la Li-TryR mediante medidas de espectroscopía de absorbancia, ya que recientemente se ha demostrado que este cofactor sólo se une a la forma dimérica de algunas reductasas³⁴. Cuando se determinaron las relaciones de absorbancia para los tres mutantes, se pudo detectar una reducción muy significativa en el caso del mutante Glu436Ala, lo que constituyó una indicación adicional del desplazamiento del equilibrio de dimerización de este mutante hacia la especie monomérica. Ensayos de dicroísmo circular revelaron que la estructura secundaria de todas las enzimas anteriores (salvaje y mutadas) era similar. Estos resultados podrían indicar que la sustitución de un residuo puntual no afectaría a la estructura secundaria del monómero pero sí al estado oligomérico de la proteína.

Por último, y junto a los estudios de oligomerización anteriores, se caracterizaron los parámetros cinéticos de la actividad oxidoreductasa de las enzimas salvaje y de las especies mutantes (Tabla 2.1). Como se puede observar en la tabla, el residuo Glu436 es altamente relevante para la actividad de la enzima. Así, se observa una pérdida considerable de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M) cuando se comparan la enzima salvaje ($1.5 \mu M^{-1} s^{-1}$) y el mutante Glu436Ala ($4 \cdot 10^{-3} \mu M^{-1} s^{-1}$). Por otro lado, la pérdida de eficacia catalítica observada en el mutante de Trp81Ala, podría explicarse debido a que este residuo aromático, localizado en el dominio de unión de FAD, tendría un papel estructural en el sitio activo de la enzima. En cambio, como hemos visto anteriormente en los estudios precedentes, no afectaría al estado de oligomerización de la enzima. Por último, el mutante de Gln439Ala no presenta diferencias significativas con la enzima salvaje.

Tabla 2.1 | Parámetros cinéticos de las especies salvaje (wt) y mutantes Trp81Ala, Glu436Ala y Gln439Ala de la TryR de *L. infantum*³⁵.

	<i>wt-TryR</i>	<i>Trp81Ala</i>	<i>Glu436Ala</i>	<i>Gln438Ala</i>
K_M (μM)	20.6	49.3	192.2	25.3
k_{cat} (s^{-1})	30.2	16.6	0.8	40.8
K_{cat}/K_M ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)	1.5	0.3	$4\cdot 10^{-3}$	1.6

En conjunto, todos estos resultados sirvieron para identificar y validar el residuo Glu436 como un elemento clave para la estabilidad funcional y estructural del dímero de la TryR, y consecuentemente, como *hot spot* del proceso de dimerización de la enzima.

2.2.2. La interfaz de dimerización de la TryR de *L. infantum* como potencial diana terapéutica

Una vez determinado que el residuo Glu436 es un residuo clave para la dimerización de la enzima, así como para la actividad enzimática, a continuación se planteó el diseño de una molécula capaz de inhibir la dimerización de la TryR. Por ello, como prueba de concepto, se diseñaron péptidos miméticos de la región de la interfaz de dimerización que contienen este residuo. Como se comentó anteriormente, este residuo se encuentra situado en una hélice α definida por los residuos Pro435–Met447, posicionada de forma paralela con su hélice análoga del otro monómero (Figura 2.8).

Así, se diseñó el péptido **2.01** (Ac-Pro-Glu-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Met-Lys-Met-NH₂) en el que se sustituyó la Cys de la posición 10 (residuo 444 en la enzima) por Ser con el fin de evitar potenciales problemas de oxidación. Además, se protegieron los extremos *N*-terminal como acetilo y *C*-terminal como carboxamida para aumentar la estabilidad frente a proteasas.

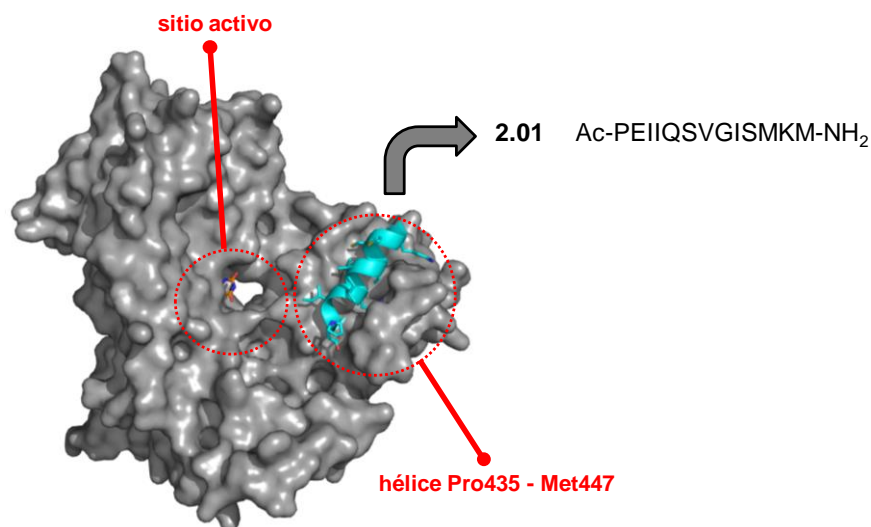


Figura 2.8 Trypanotripaniductasa de *L. infantum*. Péptido **2.01** mimético de la hélice Pro435–Met447 de la proteína nativa.

La evaluación de **2.01** en un novedoso ensayo implementado por el laboratorio del Prof. Antonio Jiménez para la detección de especie dimérica en presencia de potenciales efectores de la dimerización de la TryR (se describirá más en detalle el ensayo en la parte de evaluación biológica de este Capítulo de Tesis), puso de relieve que **2.01** era capaz de inhibir la dimerización de la enzima en el rango micromolar ($IC_{50} 41.6 \pm 4.0 \mu M$).

En su conjunto, estos datos son un punto de partida excelente y alentador para explorar en detalle esta nueva aproximación basada en la inhibición de la dimerización de la TryR considerando al péptido **2.01** como un prototipo interesante para su optimización.

2.3. Objetivos

El presente Capítulo de Tesis corresponde a los primeros pasos en el proceso de optimización del péptido prototipo **2.01** (hit) para desarrollar nuevo(s) cabeza(s) de serie más potentes y con mejores propiedades farmacológicas.

En concreto, los objetivos del presente capítulo se articulan en:

1. **Diseño racional y síntesis** de péptidos basados en el péptido **2.01** agrupados en dos series que se estudiarán de forma paralela (Figura 2.9):
 - **Serie 1.** Péptidos conformacionalmente restringidos, donde se ha introducido un cierre covalente hidrocarbonado entre dos residuos de la secuencia (péptidos grapados), con el fin de incrementar el grado de helicidad α global del péptido en disolución y mejorar sus propiedades farmacológicas.
 - **Serie 2.** Análogos lineales del prototipo **2.01**, donde se han llevado a cabo modificaciones en distintos residuos de la secuencia con el fin de optimizar dicho prototipo.

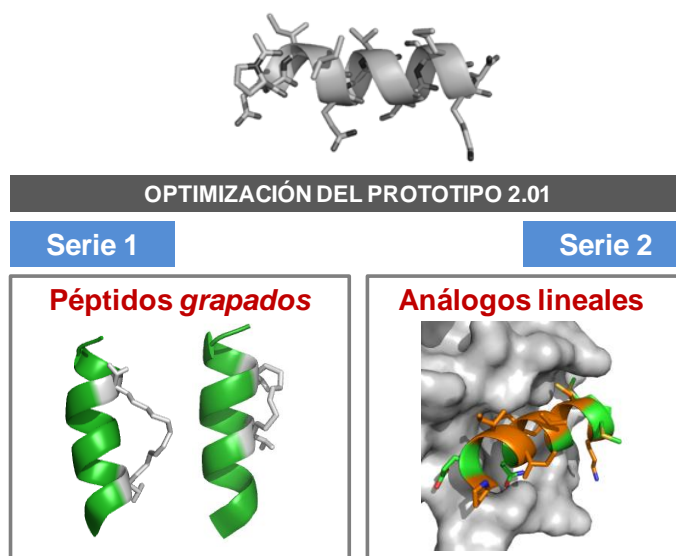


Figura 2.9 | Péptidos objetivos de este capítulo.

2. **Estudio estructural** de los péptidos grapados para evaluar la influencia del cierre covalente sobre el grado de helicidad global de los péptidos sintetizados. Para ello se lleva a cabo un análisis conformacional en disolución, mediante técnicas experimentales tales como dicroísmo circular y RMN en los laboratorios del Dr. Fernando Díaz (CIB-CSIC) y de la Dra. M.^a Ángeles Jiménez (IQFR-CSIC), respectivamente.
3. **Evaluación *in vitro*** de los péptidos sintetizados como potenciales inhibidores de la actividad oxidorreductasa de la TryR y como inhibidores del proceso de dimerización de la enzima en colaboración con el Prof. Antonio Jiménez (Universidad de Alcalá).
4. **Racionalización** de los datos experimentales de inhibición de los péptidos objetivo mediante técnicas de simulación de dinámica molecular en el laboratorio del Prof. Federico Gago (Universidad de Alcalá).

2.4. Serie 1. Péptidos conformacionalmente restringidos de 2.01

Como se comentó en los antecedentes del presente capítulo de Tesis, el péptido prototipo **2.01** se había diseñado a partir de la secuencia Pro435-Met448 de la TryR de *L. infantum* y que contiene el Glu436 (*hot spot*)³⁶. Dicha secuencia adopta una estructura de hélice α , tal y como se observa en la estructura cristalina de la enzima resuelta recientemente por difracción de rayos X²³. Sin embargo, es conocido que cuando una secuencia peptídica se encuentra en disolución, aislada del entorno proteico, raramente retiene su conformación bioactiva, adoptando un conjunto de poblaciones conformacionales sin estructura definida. Este hecho podría comprometer su capacidad para interaccionar de forma específica con su receptor o diana terapéutica³⁷, su susceptibilidad a la degradación metabólica (baja resistencia a proteasas) y su permeabilidad a través de membranas celulares. Una estrategia útil en la modulación de interacciones proteína-proteína consiste en mimetizar no sólo la secuencia de aminoácidos que definen un *hot-spot*, sino también en mimetizar o fijar la estructura secundaria que estos aminoácidos presentan en la proteína nativa³⁸.

El porcentaje de helicidad α del péptido prototipo **2.01** en disolución acuosa se estimó con la ayuda del programa de predicción AGADIR³⁹, observándose un porcentaje de helicidad extremadamente bajo (0.69% global). Así, en este capítulo, y con el fin de fijar la estructura de hélice α del péptido **2.01**, nos planteamos la preparación de péptidos conformacionalmente restringidos como primer aspecto en la optimización del prototipo lineal **2.01**.

Dentro de las distintas estrategias desarrolladas hasta la fecha para la estabilización de hélices α en disolución^{37, 40}, numerosos estudios se han centrado en la estabilización de dichas hélices α mediante interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos de la secuencia. Una primera aproximación consiste en la introducción de interacciones de tipo no covalente. Así, se han descrito diferentes interacciones de tipo polar mediante puentes salinos⁴¹ o interacciones π -catión⁴² así como interacciones hidrofóbicas⁴³ o de apilamiento π - π entre dos grupos de dinitrobenceno⁴⁴ (Figura 2.10). Las interacciones más frecuentes se

establecen entre cadenas laterales de aminoácidos que se encuentran en posiciones (i, i+3) o (i, i+4) (un paso de vuelta de hélice).

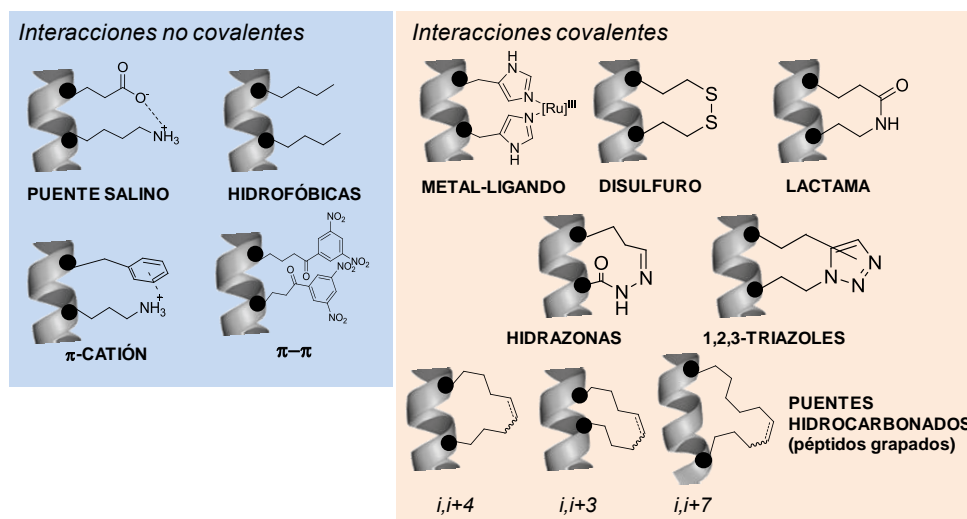


Figura 2.10 | Algunas de las estrategias empleadas para la estabilización de hélices α en fragmentos peptídicos mediante interacciones entre cadenas laterales.

Otra de las posibilidades descritas ha sido la introducción de un enlace covalente entre cadenas laterales de residuos de la misma cara de la hélice⁴⁵. Se han descrito uniones a través de interacciones metal-ligando⁴⁶, uniones a través de puentes hidrocarbonados⁴⁷, puentes hidrazona⁴⁸ y lactama^{41d, 46, 49} o puentes disulfuro⁵⁰. Más recientemente, se han usado otras metodologías eficientes para la generación de otros tipos de cierres covalentes, como son las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar entre alquino-azida (tipo *click chemistry*)⁵¹.

De todos ellos, uno de los métodos más destacables por su exitosa contribución a la estabilización de hélices α , son los denominados *péptidos grapados* a través de puentes hidrocarbonados⁴⁷ (Figura 2.10). Esta estrategia consiste en la introducción de aminoácidos portadores en su cadena lateral de grupos alqueno de longitud adecuada para luego a través de una reacción de metátesis genera el puente hidrocarbonado (Figura 2.11).

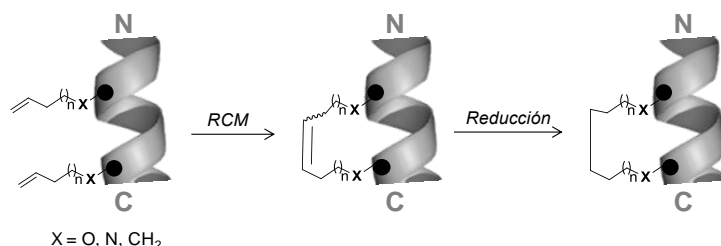


Figura 2.11 | Metodología sintética de los péptidos *grapados*⁵².

Esta metodología introducida por Blackwell y Grubbs⁵³ a finales de los 90s, ha sido refinada y explorada en profundidad por Verdine y colaboradores⁵⁴. Así, en el año 2000 describen de forma exitosa, y por primera vez, la estabilización de un fragmento C-terminal de la RNAsa H mediante reacción de RCM estudiándose la importancia de la posición, la longitud del puente así como la estereoquímica de los aminoácidos que participan en la grapa⁴⁷. En la Figura 2.12 se recogen las combinaciones óptimas de los aminoácidos α,α -disustituídos que van a participar en péptidos grapados en distintas posiciones⁴⁷. Tal y como describen los autores, en todos los casos resulta crítica la longitud del cierre covalente (es decir, el número de eslabones entre los dos residuos grapados) así como la configuración absoluta de los C α de los residuos que participan en la grapa. En concreto, en las grapas cortas (i,i+4) los mejores resultados se han obtenido con residuos no naturales de Fmoc-S-Ala(4'-pentenil)-OH (**2.02**), mientras que en las grapas i,i+7 los mejores resultados se obtienen mediante la introducción de Fmoc-R-Ala(7'-octenil)-OH (**2.05**) y Fmoc-S-Ala(4'-pentenil)-OH (**2.02**), respectivamente.

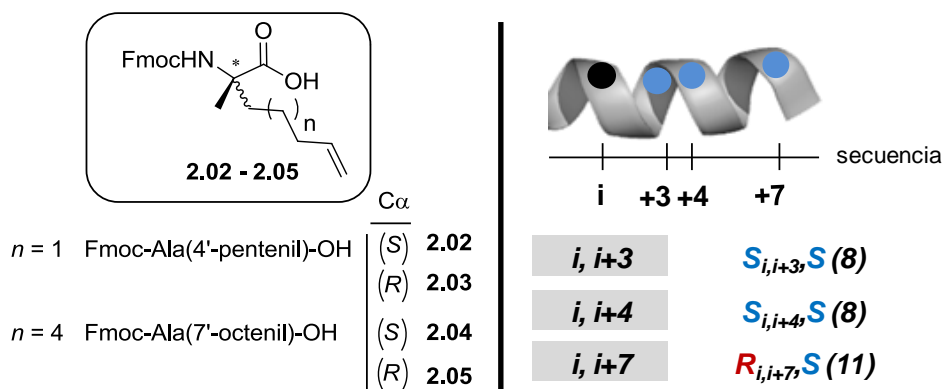


Figura 2.12 | Combinaciones óptimas de los aminoácidos **2.02-2.05** para la síntesis de péptidos grapados en las posiciones $i, i+3^{55}$, $i, i+4^{56}$ y $i, i+7^{54}$, tal y como se describe en la bibliografía. Se reproduce aquí la nomenclatura original empleada por Verdine y colaboradores⁵⁴ para los aminoácidos: en mayúsculas se indica la configuración absoluta de los $C\alpha$ de los residuos; como subíndices la posición en la secuencia; entre paréntesis el número de eslabones que forman parte del cierre covalente.

Esta metodología ha sido empleada con éxito en los campos de la química médica y biológica. En comparación con los péptidos lineales, los péptidos grapados a través de cierres hidrocarbonados han mostrado no sólo una mayor helicidad y afinidad de unión a su diana terapéutica, sino también una mayor permeabilidad a través de membranas celulares, además de observarse un aumento en su estabilidad metabólica, lo que se ha traducido en una mejora de sus actividades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*⁵⁶⁻⁵⁷.

2.4.1. Diseño *in silico* de los péptidos grapados

En nuestro caso, y en base a todo lo anterior, nos planteamos la preparación de péptidos grapados del prototipo **2.01** a través de cierres covalentes hidrocarbonados. En concreto, seleccionamos grapas $i, i+4$, para conectar un paso de vuelta hélice y grapas $i, i+7$, donde se conectan dos residuos situados a dos pasos de vuelta, con el fin de explorar un espacio conformacional lo más amplio posible. Asimismo, descartamos la hélice $i, i+3$ debido a que en base a los resultados descritos hasta la fecha no se han encontrado diferencias significativas con la grapa $i, i+4^{55}$.

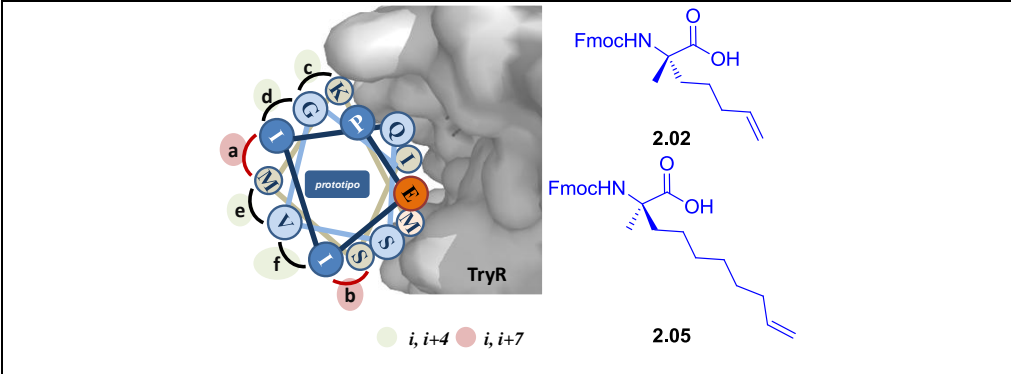
Se ha descrito que la posición de la grapa influye de forma diferencial y crítica en el grado de estructuración global y en la actividad biológica de un determinado péptido. Por este motivo en primer lugar llevamos a cabo un diseño *in silico* de las mejores posiciones para el cierre covalente que condujeran a un mayor grado de estabilización de la estructura de hélice α en el péptido **2.01**.

En la Tabla 2.2 se detallan las combinaciones de posiciones posibles en la secuencia de **2.01** (**a–f**) para la introducción de los residuos α,α -disustituídos portadores de dobles enlaces (**2.02** y **2.05**) para posteriormente dar lugar al puente hidrocarbonado en **2.01**. Todas ellas están situadas en la cara de no interacción con la enzima, tal y como se observa en la proyección helicoidal de **2.01** sobre la superficie de interacción con la Li-TryR. En concreto, se observan seis combinaciones posibles: **a** y **b** (grapas $i,i+7$, en color rojo) y **c–f** (grapas $i,i+4$, en color verde). Las posibilidades que no se especifican se situarían en la zona de interacción con la enzima y serían, a priori, contraproducentes en el efecto inhibitorio de los correspondientes péptidos grapados.

La evaluación del grado de helicidad de cada uno de los seis posibles péptidos grapados **a–f** se llevó a cabo mediante simulación de dinámica molecular (DM) haciendo uso de AMBER⁵⁸ (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), uno de los programas *in silico* más utilizados para la simulación de biomoléculas. Además, y como control, se llevó a cabo igualmente la simulación del prototipo lineal **2.01** en las mismas condiciones.

Los péptidos **a–f** y el prototipo **2.01** se situaron en una caja rectangular de aguas TIP3P⁵⁹ separados unos 10 Å de los límites de la caja (Figura 2.13). Como hipótesis de partida, en todos los casos se introdujo el cierre covalente en su forma insaturada, escogiéndose el isómero Z del doble enlace. Todos los péptidos se simularon con los extremos N- y C-terminal protegidos en forma de acetilo y carboxamida terminal, respectivamente. Además, se sustituyeron los residuos de Met por residuos hidrófobos similares, como la norleucina (Nle), con el fin de evitar potenciales problemas oxidación y aumentar la estabilidad de los péptidos.

Tabla 2.2 | Posibles posiciones del cierre covalente (**a–f**) en el diseño de péptidos grapados análogos del péptido **2.01*** y estructura de los aminoácidos α,α -disustituídos **2.02** y **2.05**.



péptido	secuencia													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
2.01	P	E	I	I	Q	S	V	G	I	S	N _L	K	N _L	
Grapas <i>i</i> +7	a	P	E	I	2.05	Q	S	V	G	I	S	2.02	K	N _L
	b	P	E	2.05	I	Q	S	V	G	I	2.02	N _L	K	N _L
	c	P	E	I	I	Q	S	V	2.02	I	S	N _L	2.02	N _L
Grapas <i>i</i> +4	d	P	E	I	2.02	Q	S	V	2.02	I	S	N _L	K	N _L
	e	P	E	I	I	Q	S	2.02	G	I	S	2.02	K	N _L
	f	P	E	2.02	I	Q	S	2.02	G	I	S	N _L	K	N _L

* Proyección del péptido prototipo **2.01** sobre la TryR y posibles posiciones del cierre covalente **a–f** en el diseño de péptidos grapados. En naranja se señala el residuo Glu2 (mimético del Glu436). N_L: norleucina

Los sistemas **a–f** y **2.01** se construyeron usando la herramienta *tLeap*, integrada en AMBER. Para ello, fue necesario construir previamente los archivos PREP de entrada de los residuos no proteinogénicos de α -(4'-pentenil)-S-alanina (**2.02**), α -(7'-octenil)-*R*-alanina (**2.05**) y Nle. Como se indica en la Figura 2.13, una vez construido el sistema a simular, los pasos que se siguieron fueron: minimización de las moléculas de agua e iones presentes en la caja rectangular, calentamiento del sistema (sin ninguna restricción) desde 100 a 300 K, equilibrado del sistema (en cinco ciclos consecutivos, donde se van liberando todas las moléculas del sistema), y por último, la simulación de MD. Todas las dinámicas moleculares para los péptidos **a–f** y **2.01** se llevaron a cabo a 300 K durante 100 ns sin ningún tipo de restricción.

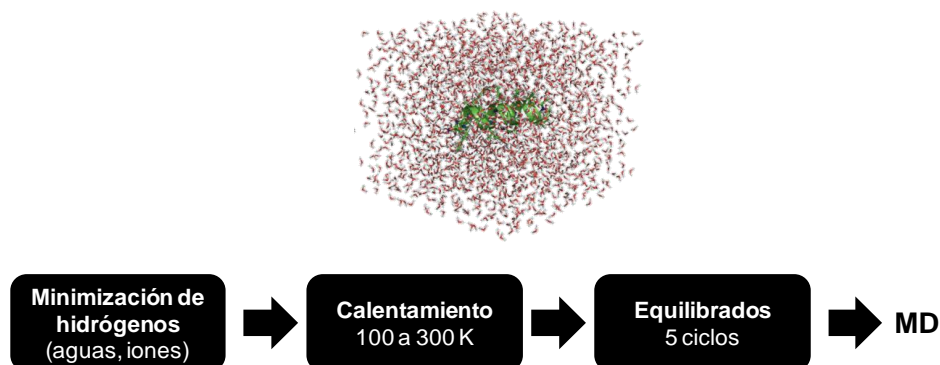


Figura 2.13 | Los péptidos **a-f** y **2.01** (en verde) se simularon en una caja rectangular en agua a 300 K durante 100 ns. Arriba se indica una imagen de la caja de agua. Abajo se indican los pasos seguidos en la simulación de MD.

Las simulaciones de DM de los péptidos **a-f** y **2.01** resultantes, se analizaron con la herramienta para el análisis de trayectorias *ptraj* de AMBER (Figura 2.14). Esta herramienta, entre otras posibilidades, permite determinar el grado de helicidad por residuo basándose en el algoritmo DSSP desarrollado por Kabsch y Sander⁶⁰. DSSP es un método estándar para reconocer cada tipo de estructura secundaria dependiendo del patrón de enlaces de hidrógeno.

Como se puede observar en la Figura 2.14, y acorde a nuestra hipótesis inicial, la presencia del cierre covalente en los péptidos **a-f** supone un incremento considerable en el grado de helicidad por residuo en todos los casos si se compara con el prototipo **2.01**. Asimismo, se observan diferencias importantes en el grado de estructuración de los péptidos dependiendo de la posición del cierre covalente. Así, en las posibles grapas $i, i+7$ (péptidos **a** y **b**) se observa una mayor estructuración hacia el extremo *N*-terminal, alcanzándose valores absolutos cercanos al 50% de helicidad. En cuanto a las posibles grapas $i, i+4$ (péptidos **c-f**), en general, dan lugar también a una mayor estructuración hacia el extremo *N*-terminal, pero eso sí, en menor grado que las grapas largas **a-b** (en valor absoluto). Cabe resaltar que el efecto de estructuración observado en el péptido **d** (color lila en Figura 2.14) se reparte a lo largo de la hélice, también hacia el extremo C-terminal.

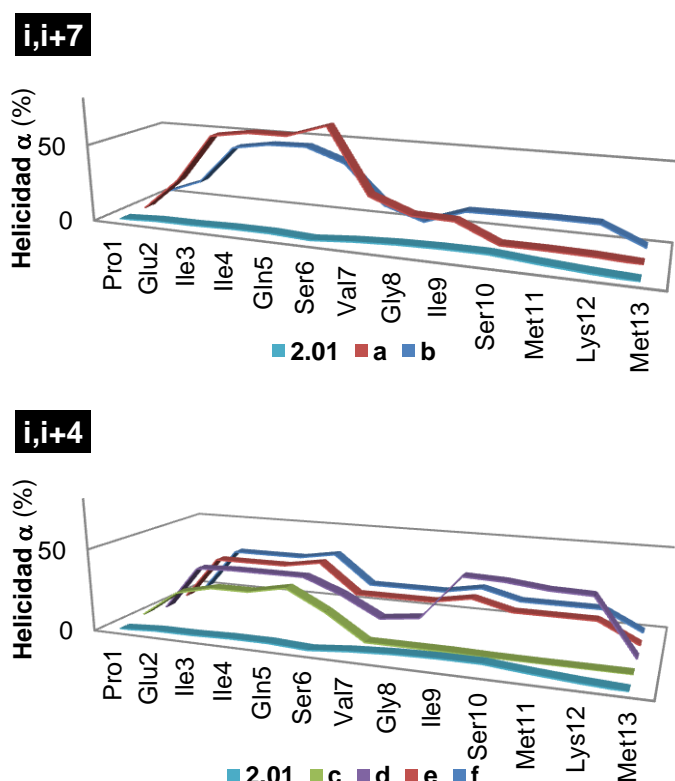


Figura 2.14 | Evaluación del grado de helicidad por residuo de los péptidos **a-f** mediante el algoritmo DSSP implementado con *ptraj* en AMBER.

Basándonos en estos resultados de predicción de helicidad, de todas las posibilidades de péptidos grapados, decidimos sintetizar y estudiar: para las grapas *i,i+7* el péptido **a** (color rojo, Figura 2.14) ya que es el que presenta una mayor estructuración hacia el extremo N-terminal y para las grapas *i,i+4*, el péptido **d** (color lila, Figura 2.14) en el que al localizarse el cierre covalente en el centro de la hélice, se observaba una propagación de la estructura a lo largo de toda la hélice. En la Figura 2.15 se recogen las estructuras de los péptidos grapados objetivo seleccionados **2.06** y **2.07** correspondientes a las mejores opciones de cierre covalente **a** y **d**, respectivamente, en base al diseño *in silico* precedente.

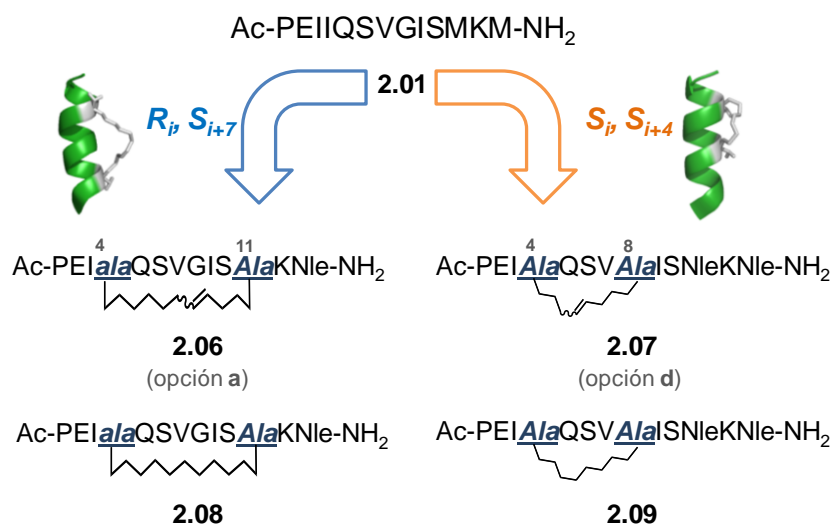
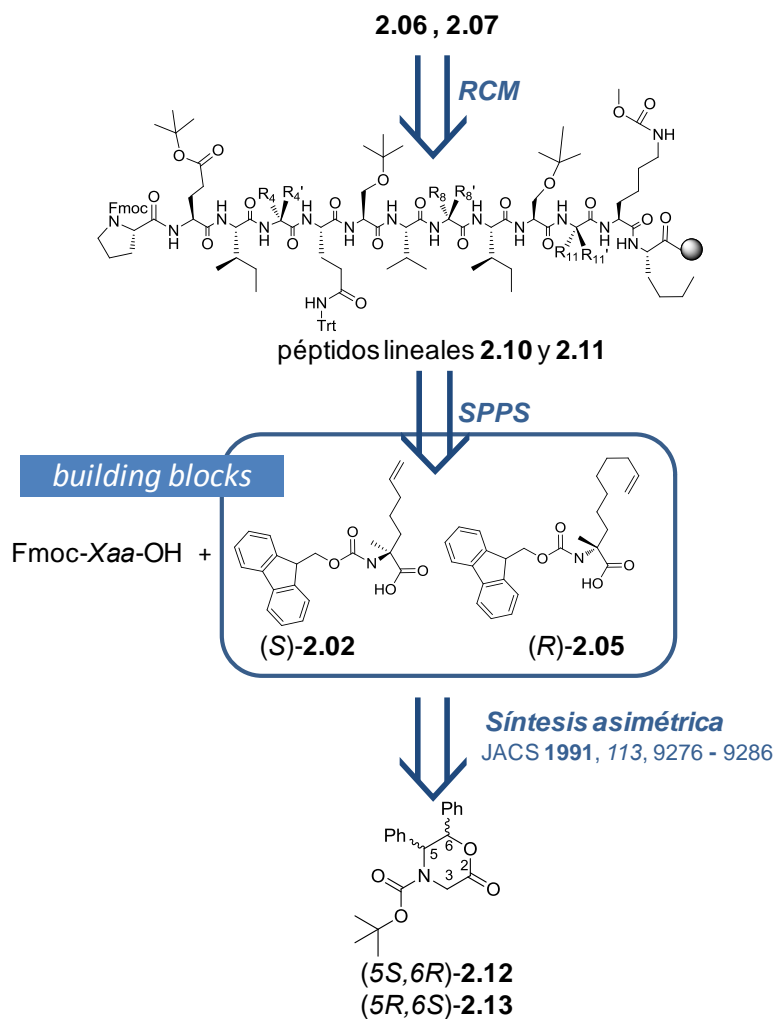


Figura 2.15 | Estructura de los péptidos grapados **2.06-2.09** propuestos. En gris se indican las posiciones elegidas para el cierre covalente. En minúscula (*ala*) se muestran los aminoácidos de configuración absoluta *R*.

Tal y como se comentó en el diseño inicial, se propuso la sustitución de los residuos de Met por Nle, estrategia ampliamente extendida para superar los potenciales problemas de oxidación de estos residuos. Asimismo, nos planteamos la preparación de los correspondientes péptidos saturados **2.08** y **2.09** con el fin de explorar un mayor espacio conformacional.

2.4.2. Síntesis de los péptidos grapados 2.06-2.09

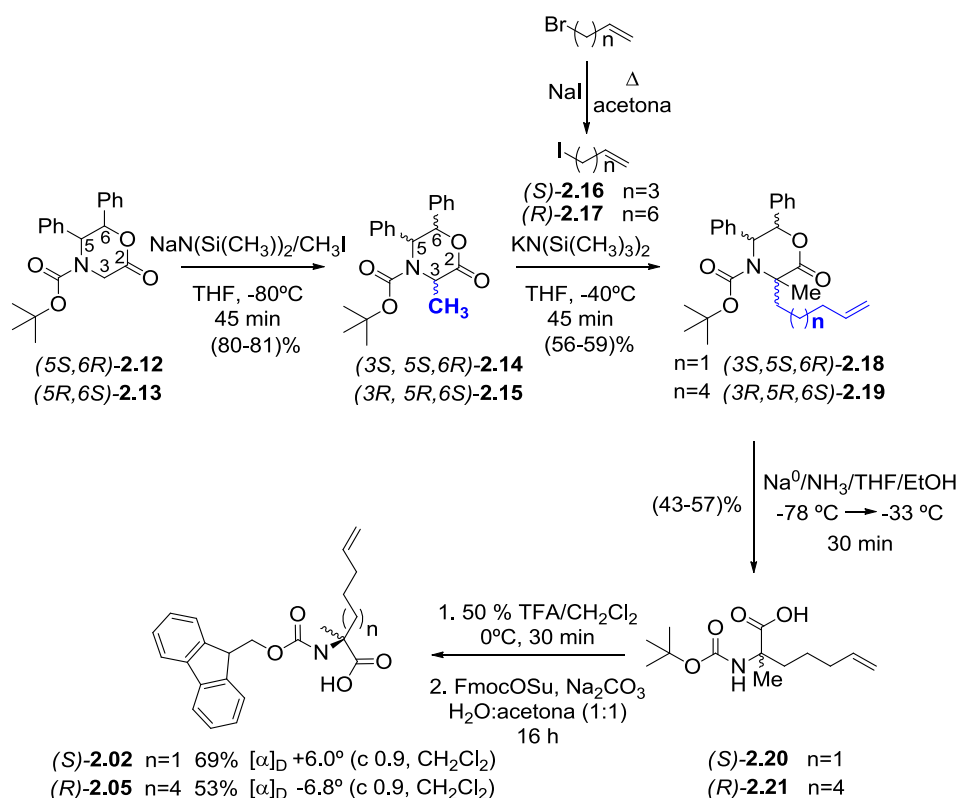
La síntesis de los péptidos grapados **2.06** (i,i+7) y **2.07** (i,i+4) consistió, en primer lugar, en la obtención de sus precursores lineales anclados a la resina **2.10** y **2.11** mediante metodología estándar de SPPS incorporando en la posición adecuada los residuos Fmoc-*R*-Ala(7'-octenil)-OH (**2.02**) y Fmoc-*S*-Ala(4'-pentenil)-OH (**2.05**). Como paso previo fue necesaria la síntesis asimétrica de los aminoácidos cuaternarios no proteinogénicos de partida **2.02** y **2.05** preparados a partir de **2.12** y **2.13** (Esquema 2.1).



Esquema 2.1 | Esquema retrosintético de los péptidos objetivo **2.06** y **2.07**.

2.4.2.1. Síntesis asimétrica de los aminoácidos cuaternarios de partida

La síntesis asimétrica de los aminoácidos cuaternarios enantioméricamente puros **2.02** y **2.05** se realizó a partir de las difeniloxazinonas quirales **(5S,6R)-2.12** y **(5R,6S)-2.13** siguiendo el procedimiento descrito por Williams y colaboradores⁶¹ y las modificaciones descritas por el grupo de Verdine⁵⁴ (Esquema 2.2).



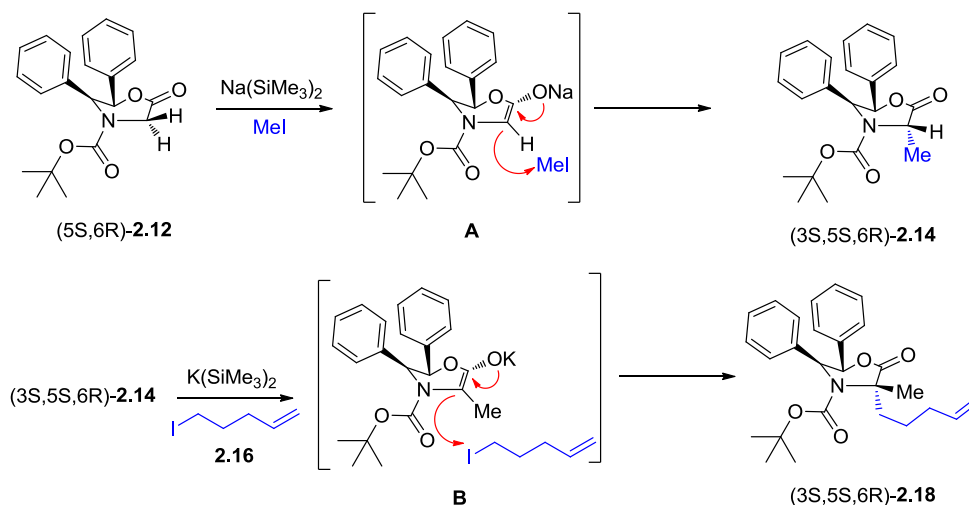
Esquema 2.2 | Síntesis asimétrica de (5*S*)-**2.02** y (5*R*)-**2.05**.

Así, el tratamiento de (5*S*,6*R*)-**2.12** y (5*R*,6*S*)-**2.13** con hexametildisilazano de sodio en presencia de yoduro de metilo (MeI) permitió obtener los productos de alquilación (3*S*,5*S*,6*R*)-**2.14** y (3*R*,5*R*,6*S*)-**2.15** con un 80 y 81% de rendimiento, respectivamente (Esquema 2.2). Los valores de pureza óptica fueron $[\alpha]_D^{25} -65.5^\circ$ (c 0.2, CH₂Cl₂) y $[\alpha]_D^{25} +67.0^\circ$ (c 0.2, CH₂Cl₂) para (3*S*,5*S*,6*R*)-**2.14** y (3*R*,5*R*,6*S*)-**2.15**, respectivamente, y los puntos de fusión medidos en los dos casos coinciden con los descritos en la bibliografía⁶¹, indicando excesos diastereoméricos superiores al 98%. Seguidamente, el tratamiento de las difenilmetiloxazinonas (3*S*,5*S*,6*R*)-**2.14** y (3*R*,5*R*,6*S*)-**2.15** con yoduro de 4'-pentenilo (**2.16**) y yoduro de 7'-octenilo (**2.17**), respectivamente, condujo a los productos de alquilación diastereoselectiva en C-3 (3*S*,5*S*,6*R*)-**2.18** y (3*R*,5*R*,6*S*)-**2.19** con rendimientos del 59 y del 56%, respectivamente (Esquema 2.2). Los yoduros de alquenilo **2.16** y

2.17 se prepararon a partir de los correspondientes bromuros mediante reacción de transhalogenación en reflujo de acetona⁶² y se utilizaron inmediatamente en la reacción. Para esta segunda etapa de alquilación, se empleó como base la sal potásica de hexametildisilazano para la generación del enolato y se elevó la temperatura de reacción a -40 °C, tal y como se recoge en el procedimiento modificado por Verdine y colaboradores⁵⁴, ya que la segunda alquilación está energéticamente más desfavorecida⁶¹.

Posteriormente, el tratamiento de (3*S*,5*S*,6*R*)-**2.18** y (3*R*,5*R*,6*S*)-**2.19** con una disolución de THF saturada con NH₃ en presencia de Na(0)⁶¹ condujo a la obtención de los Boc-aminoácidos (*S*)-**2.20** y (*R*)-**2.21** con unos rendimientos del 43 y 57%, respectivamente (Esquema 2.2). Por último, se llevó a cabo la desprotección en medio ácido del extremo *N*-terminal de (*S*)-**2.20** y (*R*)-**2.21** y posterior protección con el grupo Fmoc en condiciones estándar⁵⁴, para dar lugar a los aminoácidos cuaternarios finales (*S*)-**2.02** y (*R*)-**2.05**, con unos rendimientos del 69 y 53%, respectivamente.

La topicidad de la reacción diastereoselectiva de alquilación de los enolatos anteriores puede racionalizarse según el modelo recogido en el Esquema 2.3, donde se considera que el enolato adopta una conformación de silla-bote⁶¹. En la primera metilación, el electrófilo (MeI) se aproximaría por la cara del enolato **A** opuesta a los dos fenilos (cara *Si*⁶³) obteniéndose el producto *anti* de α -metilación. En la segunda adición, y de nuevo en una conformación de silla-bote para el enolato **B**, la orientación de los dos fenilos en el heterociclo determinan de nuevo la entrada del electrófilo por la cara *Si* del enolato⁶¹. La doble alquilación en α supone una retención neta en la configuración absoluta del C-3, ya que en la segunda reacción, el ataque se produce de nuevo sobre la cara menos impedida y el sustituyente (alquenilo) entrante presenta una mayor prioridad según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog⁶⁴ que el primer electrófilo (metilo).



Esquema 2.3 | Modelo para explicar la topicidad de la reacción de adición consecutiva de los dos electrófilos sobre la difeniloxazinona. Adaptado de la referencia⁶¹.

Aunque la síntesis de los aminoácidos (*S*)-2.12 y (*R*)-2.15 está descrita en la bibliografía⁵⁴, no hemos sido capaces hasta la fecha de encontrar datos de purezas ópticas o puntos de fusión para estos compuestos en ninguna publicación. Por ello, y con el fin de determinar de forma inequívoca la configuración absoluta del nuevo centro estereogénico en los aminoácidos (*S*)-2.12 y (*R*)-2.15 así como su exceso enantiomérico (ee), decidimos llevar a cabo una doble derivatización de los dos aminoácidos con un auxiliar quiral de forma covalente. Esta estrategia consiste en hacer reaccionar un sustrato con un centro estereogénico de configuración absoluta desconocida con los dos enantiómeros puros de un auxiliar quiral dado (Figura 2.16). A continuación, se comparan los espectros de RMN de los diastereómeros resultantes. La configuración absoluta del centro estereogénico objetivo se establece entonces a partir de un modelo de correlación entre la disposición conformacional más significativa en RMN de los productos de derivatización con las diferencias observadas en los valores de desplazamiento químico ($\Delta\delta$) al comparar los espectros de RMN de los dos epímeros.

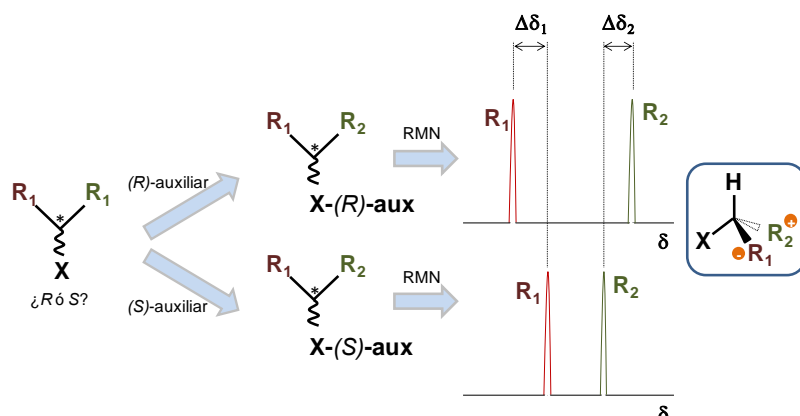


Figura 2.16 | Procedimiento general de derivatización con un auxiliar quiral para la determinación de la configuración absoluta de un centro estereogénico mediante RMN.

En nuestro caso elegimos como agente derivatizante quiral el cloruro de Mosher (cloruro de 2-metoxi-2-fenil-2-trifluoroacetilo, MTPACl) para preparar las correspondientes amidas de Mosher⁶⁵ **2.22-2.25** (Esquema 2.4). Para ello, se desprotegieron los aminoácidos (S)-**2.02** y (R)-**2.05** en medio ácido y se derivatizaron posteriormente con sendos enantiómeros del cloruro de Mosher. La elucidación de la configuración absoluta de los centros cuaternarios en **2.22-2.25** se realizó según el método de Mosher^{65a}, que se basa en el efecto anisotrópico que ejerce el fenilo presente en MTPA sobre los sustituyentes enlazados al centro estereogénico cuya configuración absoluta va a ser determinada⁶⁶ (Figura 2.17).

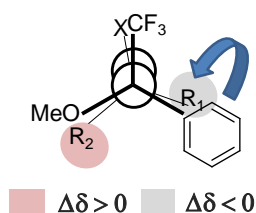
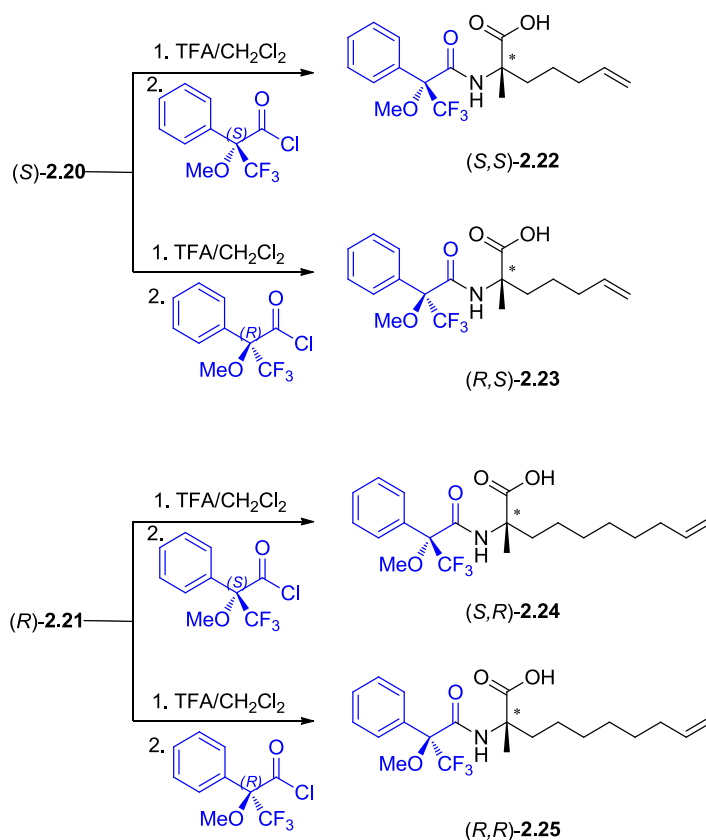


Figura 2.17 | Efecto anisotrópico del fenilo sobre el sustituyente R₁. Se señalan en colores los signos de la diferencia de desplazamientos químicos (Δδ, ppm) entre las amidas S- y R-de Mosher. Δδ = δ_S - δ_R.



Esquema 2.4 | Síntesis de las amidas de Mosher **2.22-2.25**.

Primero se define el confórmero más significativo en RMN para los productos de derivatización, asumiendo que el enlace amida se encuentra en forma *trans*, y que el grupo CF₃ es sincoplanar con el plano definido por el enlace amida^{65a}. Seguidamente se determina la variación en el desplazamiento químico ($\Delta\delta$, ppm) para los sustituyentes R₁ y R₂, que se define como la diferencia entre el valor de desplazamiento químico observado para un sustituyente en la amida de Mosher derivada del empleo de *S*-MTPA y el valor observado en la amida derivada del empleo de *R*-MTPA ($\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$, ppm). Por último, y según los valores de $\Delta\delta$ de R₁ y R₂, se colocan en el modelo conformacional definido inicialmente teniendo en cuenta el efecto inductivo del fenilo, lo que permite determinar la configuración absoluta del centro estereogénico estudiado.

En la Figura 2.18 se muestra el modelo conformacional propuesto en nuestro caso para la elucidación de la configuración absoluta de los aminoácidos (*S*)-**2.02** y (*R*)-**2.05**. Como se puede observar en la figura, en este modelo el grupo carboxílico se encontraría en el plano definido por amida y CF_3 , sincoplanar con el oxígeno amídico, debido a una interacción estabilizante a través de un enlace de hidrógeno entre el grupo OH del ácido y el oxígeno del enlace amida⁶⁷ (señalados en azul). Los sustituyentes marcados en negro quedarían por encima o por debajo de este plano, siendo entonces apantallados o no por el fenilo, dependiendo de la configuración absoluta del centro cuaternario.

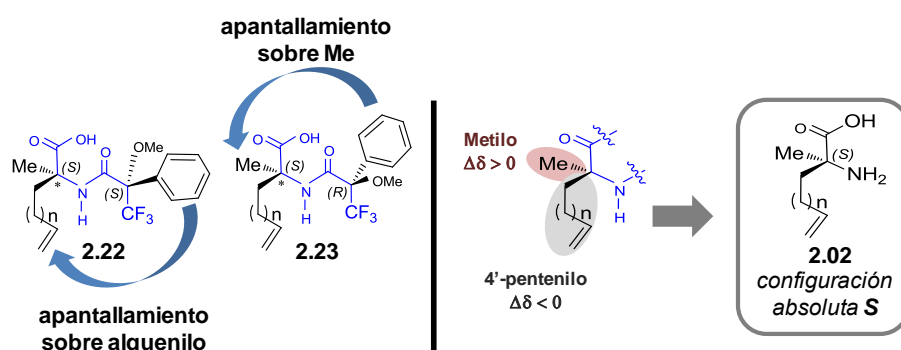


Figura 2.18 | Modelo propuesto para la elucidación de la configuración absoluta de las amidas de Mosher **2.22** y **2.23**.

El análisis de los espectros de ^1H -RMN de las amidas **2.22-2.25** permitió determinar los valores de $\Delta\delta$ para los sustituyentes de los aminoácidos (Figura 2.19). Según nuestro modelo, las amidas **2.22** y **2.23** (provenientes de **2.20**) presentan valores de $\Delta\delta > 0$ para el $\alpha\text{-CH}_3$ y valores de $\Delta\delta < 0$ para el sustituyente de 4'-pentenilo. Ello indicaría que en la amida de Mosher **2.22** el fenilo apantallaría al grupo 4'-pentenilo, presentando por ello valores de $\Delta\delta$ negativos. En cambio, en el caso de las amidas **2.24** y **2.25** (provenientes de **2.21**) se observaron valores de signo contrario: $\Delta\delta < 0$ para el $\alpha\text{-CH}_3$ y $\Delta\delta < 0$ para el sustituyente de 7'-octenilo. En base a estos resultados, se determinó que la configuración absoluta de los aminoácidos sintetizados es (*S*)-**2.02** y (*R*)-**2.05**.

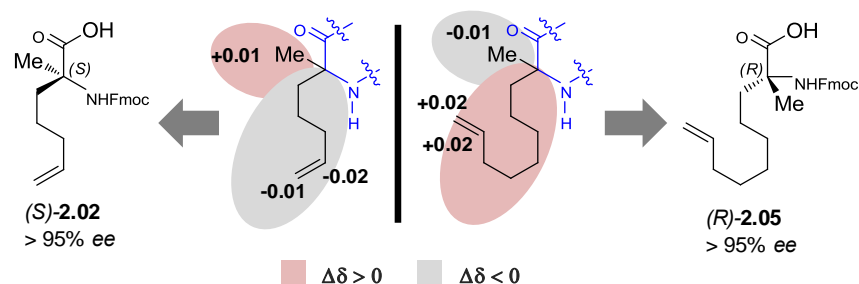


Figura 2.19 | Determinación de la configuración absoluta de los aminoácidos (S)-**2.02** y (R)-**2.05** mediante el método de Mosher. Se señalan las diferencias de valores de los desplazamientos químicos ($\Delta\delta$, ppm) más significativas, que corresponden a los protones vinílicos y al α -CH₃. $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$, ppm.

Por último, y basándonos en el análisis por ^{19}F -RMN, se determinó un exceso diastereomérico (*ed*) superior al 95% en las amidas **2.22-2.25**, lo que permitió determinar por correlación unos excesos enantioméricos (*ee*) superiores al 95% en los aminoácidos (S)-**2.02** y (R)-**2.05**. En la Figura 2.20 se recoge el espectro de ^{19}F -RMN de la amida de Mosher (R,S)-**2.23** como ejemplo. Finalmente, se señala que los valores experimentales de pureza óptica determinados fueron $[\alpha]_D^{25} +6.0^\circ$ (c 1.1, CH₂Cl₂) para (S)-**2.02** y $[\alpha]_D^{25} -6.8^\circ$ (c 0.9, CH₂Cl₂) para (R)-**2.05** (Figura 2.20).

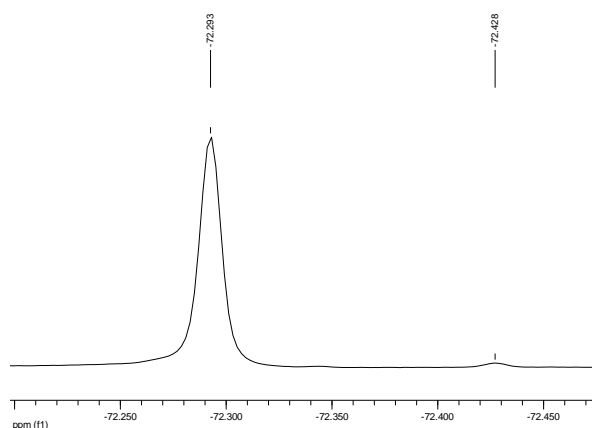
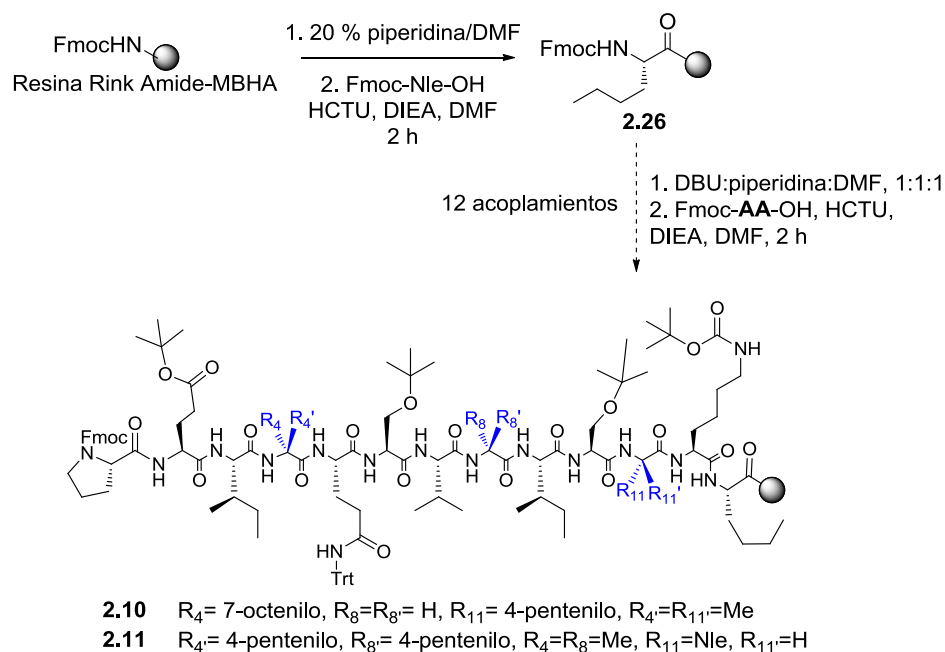


Figura 2.20 | Espectro de ^{19}F -RMN de (R,S)-**2.23**, donde se observa un pico mayoritario a -72.29 ppm (*ed* > 95%).

2.4.2.2. Elongación y reacción de metátesis

Una vez sintetizados los aminoácidos cuaternarios de partida **2.02** y **2.05**, se llevó a cabo la síntesis de los péptidos lineales anclados a la resina **2.10** y **2.11**, siguiendo los protocolos generales de síntesis en fase sólida ya descritos en el capítulo anterior, comenzando con el anclaje del aminoácido Fmoc-Nle-OH a la resina tipo HMBA con espaciador de tipo Rink Amida (Esquema 2.5). Se determinó la carga experimental de la resina **2.26** siguiendo el método descrito por Chan y colaboradores⁶⁸ basado en la medida cuantitativa de complejo Fmoc-piperidina en disolución mediante espectroscopia de absorción. En todos los casos la carga se correspondió con la teórica de 0.47 mmol/g. A continuación, se fueron introduciendo, uno a uno y de manera secuencial, el resto de aminoácidos hasta el *N*-terminal para dar lugar a los péptidos lineales anclados a la resina **2.10** y **2.11** siguiendo el procedimiento general descrito en presencia de HCTU como agente de acoplamiento (Esquema 2.5).

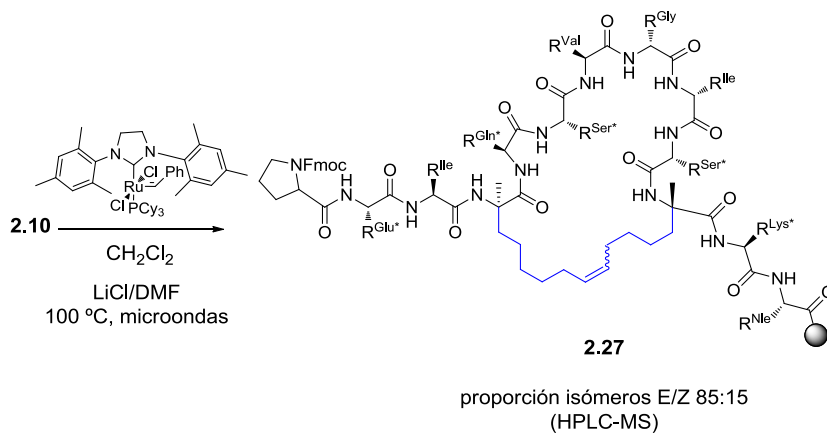


Esquema 2.5 | Síntesis en fase sólida de los péptidos lineales precursores **2.10** y **2.11**. Los aminoácidos cuaternarios se indican en azul.

A diferencia de la síntesis de los péptidos del Capítulo 1, en este caso, y debido a la mayor longitud de los péptidos **2.10** y **2.11** (13 aminoácidos), se empleó una mezcla de 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU), piperidina y DMF (1:1:48) para la desprotección del extremo N-terminal como paso previo al acoplamiento del siguiente aminoácido. Según describen Tickler y colaboradores⁶⁹, el empleo de DBU permite superar problemas de falta de reactividad debido a agregación o inaccesibilidad de la base al extremo N-terminal.

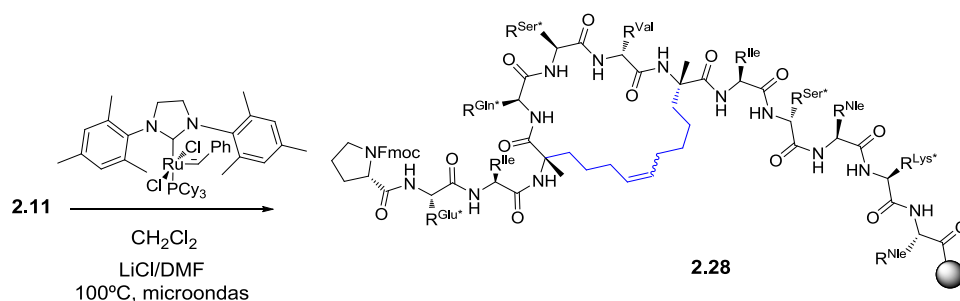
A continuación, se llevó a cabo la reacción de metátesis en los péptidos lineales precursores **2.10** y **2.11** protegidos en forma Fmoc en su extremo N-terminal con el fin de obtener los péptidos grapados objetivo **2.06** y **2.07**. Para ello, decidimos hacer uso de las condiciones optimizadas en la síntesis de los hexapéptidos cíclicos descritos en el capítulo anterior. Estas condiciones implicaban el empleo de un 20% mol de catalizador de segunda generación de Grubbs, LiCl como agente caotrópico⁷⁰ y CH₂Cl₂ como disolvente. La reacción se llevaba a cabo a 100°C con irradiación de microondas.

Así, cuando se llevó a cabo la reacción de RCM del péptido lineal anclado a la resina **2.10** en las condiciones anteriores (Esquema 2.6), se observó la desaparición del producto de partida en tan sólo 30 min de reacción. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante HPLC-MS, donde se detectaron dos picos con la masa de **2.27** a 4.20 min (mayoritario) y 4.01 min (minoritario) en una proporción aproximada de 85:15 y desaparición del producto de partida. En base a que eluían antes que el producto de partida **2.10** (t_R = 4.45 min), característica común en péptidos cíclicos frente a sus precursores lineales⁷¹, y a que presentaban el mismo patrón de ionización en el espectro de MS, se consideró que estos picos correspondían a los dos isómeros geométricos (E/Z) del doble enlace en **2.27**.



Esquema 2.6 | Síntesis del péptido grapado **2.27** anclado a la resina (i,i+4) mediante reacción de RCM.

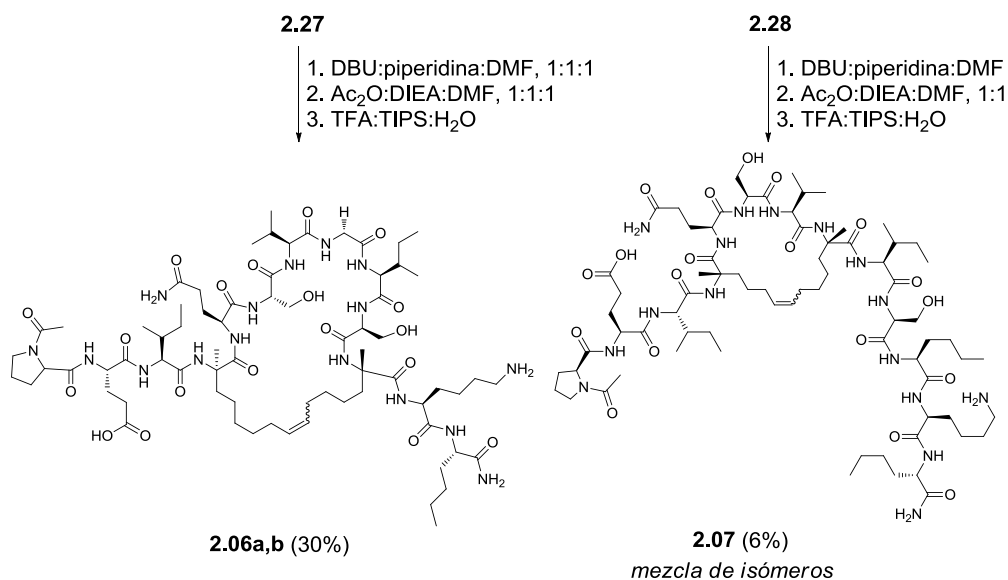
De manera similar, se realizó la reacción de metátesis sobre el péptido lineal **2.11**, para dar lugar al péptido grapado i,i+4 (**2.28**) (Esquema 2.7). En este caso se requirieron tiempos de reacción más prolongados (150 min) que en el caso anterior, probablemente debido a impedimentos estéricos en la formación de un ciclo más corto.



Esquema 2.7 | Síntesis del péptido grapado **2.28** anclado a la resina (i,i+7) mediante reacción de metátesis.

A diferencia del péptido cíclico i,i+7 (**2.27**), en HPLC-MS de **2.28** sólo se observó un único pico a 4.67 min cuyo análisis de masas coincidió con la del ión de relación m/z 849 ($[(M+2H)/2]^+$) de **2.28**.

Por último, se eliminó el grupo Fmoc del extremo N-terminal de los péptidos anclados a la resina **2.27** y **2.28** y se llevó a cabo su acetilación y desanclaje en condiciones estándar (Esquema 2.8). Los crudos de reacción fueron purificados en un cartucho de fase reversa, obteniéndose los péptidos objetivo **2.06** (30% de rendimiento global) y **2.07** (6% de rendimiento global) con una pureza analítica superior al 98% en los dos casos. Mientras que en el péptido grapado *i,i*+7 (**2.06**) se consiguió separar parcialmente los isómeros E/Z (9:1), que se denominaron **2.06a** (mayoritario) y **2.06b** (minoritario), en el caso del péptido grapado *i,i*+4 (**2.07**) no fue posible, determinándose por RMN que **2.07** se había obtenido como una mezcla de isómeros E/Z en proporciones 58:42. En ninguno de los casos se pudo asignar de manera inequívoca la geometría del doble enlace en cada uno de los isómeros debido a la complejidad de los espectros de RMN.



Esquema 2.8 | Síntesis de los péptidos grapados objetivo **2.06a,b** (*i,i*+7) y **2.07** (*i,i*+4).

2.4.2.3. Síntesis en disolución de los péptidos grapados saturados

Para acceder a los péptidos grapados saturados **2.08** y **2.09**, se llevó a cabo la reducción mediante hidrogenación catalítica en disolución de los crudos de

reacción **2.06a,b** y **2.07**. Así, los primeros intentos de reducción de **2.06a,b** con H_2 (1 atm) y Pd/C usando MeOH como disolvente en presencia de HCl (1.5 eq.), condujeron al producto de reducción del doble enlace **2.29**, pero con el grupo amino de la Lys12 dimetilado, tal y como se detectó por HRMS.

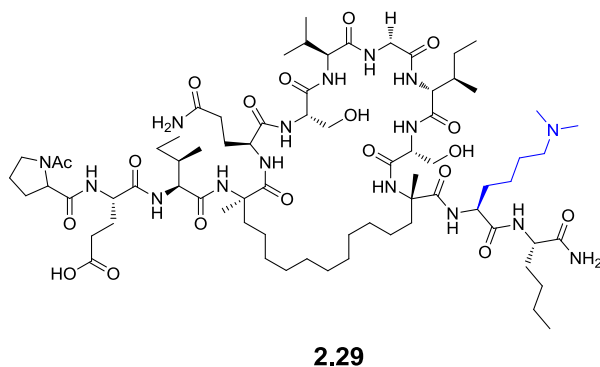
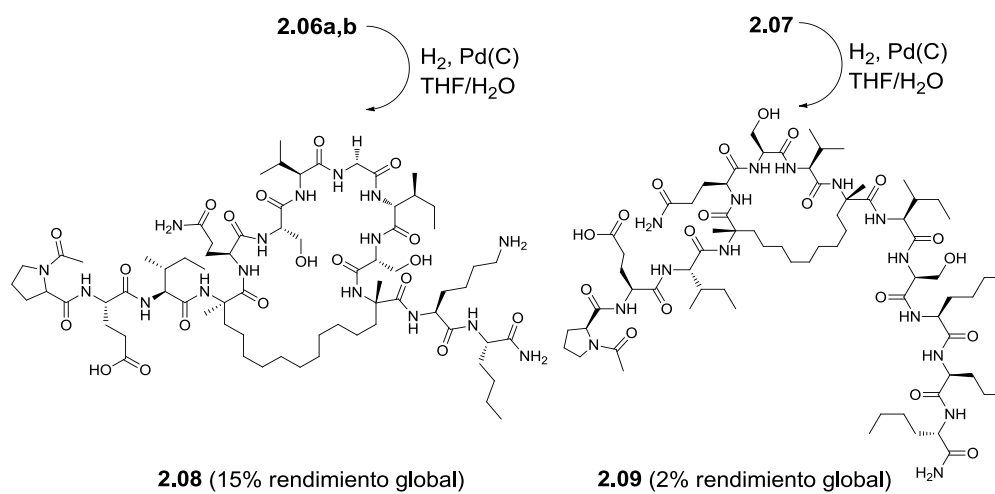


Figura 2.21 | Primeros intentos de reducción catalítica de **2.06a,b** en disolución, usando MeOH como disolvente. Se marca la Lys12 dimetilada en azul en **2.29**.

Sin embargo, cuando la hidrogenación catalítica se llevó a cabo en una mezcla de THF:H₂O, 1:1 (Esquema 2.9) se evitó el problema de N-metilación de la Lys, dando lugar, tras purificación cromatográfica en un sistema de extracción con cartucho de fase reversa, al aislamiento de los análogos saturados deseados **2.08** y **2.09** con rendimientos globales del 15 y 2% y purezas del 90 y 82%, respectivamente.



Esquema 2.9 | Síntesis en disolución de los péptidos grapados saturados **2.08** y **2.09**.

2.4.3. Estudio estructural en disolución

Una vez obtenidos los péptidos grapados **2.06-2.09**, se realizó el análisis conformacional de los péptidos en disolución acuosa mediante espectroscopia de dicroísmo circular y RMN.

2.4.3.1 Dicroísmo circular

La espectroscopia de dicroísmo circular se basa en la distinta respuesta que presenta un cromóforo quiral cuando sobre él incide una irradiación de luz circularmente polarizada. En el proceso de interacción entre la luz incidente y la molécula portadora del cromóforo, la absorción de los componentes que integran la irradiación no es homogénea, ocurriendo de forma diferencial según su longitud de onda así como su orientación en el espacio. En este sentido, la irradiación restante (no absorbida) del proceso de interacción luz-cromóforo dependerá de la naturaleza química de la molécula así como de su quiralidad.

Sin duda, una de las mayores aplicaciones del dicroísmo circular es su empleo como técnica para la determinación de la estructura secundaria de proteínas y péptidos⁷². Aunque no permite una resolución atomista, como el caso de la RMN o la cristalografía de rayos X, el dicroísmo circular es una herramienta rápida, sencilla y útil para estudiar procesos en proteínas y péptidos relativos a su conformación espacial.

En la Figura 2.22 se representa de forma esquemática los perfiles ideales de dicroísmo circular característicos de los elementos de estructura secundaria en proteínas, las cuales presentan actividad óptica en la región lejana del UV (180-250 nm). Dependiendo de su estructura secundaria (o de los ángulos diedros del conjunto de los enlaces amida), la intensidad en la absorción en esta región del espectro será distinta, presentado diferentes espectros según la estructura secundaria de la proteína sea:

- **Hélice α :** se caracteriza por presentar dos mínimos negativos a 208 y 222 nm y un máximo positivo a 192 nm.

- **Hoja β :** presentaría un solo mínimo negativo a 218 nm y un máximo a 196 nm.
- **Péptido con estructura desordenada (*random coil*):** presentaría un mínimo negativo 195 nm (de valor negativo).

Normalmente, la estructura secundaria de una proteína está constituida por estos tres elementos, siendo el espectro de dicroísmo circular una combinación ponderada de los tres casos ideales anteriores.

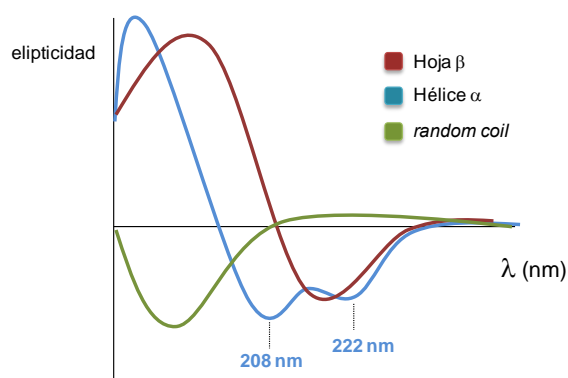


Figura 2.22 | Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano para tres estructuras ideales de una proteína: hoja β , hélice α y *random coil*.

Las medidas de dicroísmo circular de los péptidos conformacionalmente restringidos se llevaron a cabo empleando una disolución acuosa con 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) como agente solvatante, debido a que el prototipo **2.01**, péptido de referencia para el estudio, presenta una baja solubilidad en agua. Este co-disolvente, de baja constante dieléctrica respecto al agua y alto momento dipolar, ayuda además a estabilizar proteínas en disolución ya que favorece interacciones intramoleculares⁷³. Así, el empleo de este disolvente fluorado mejoraría tanto la solubilidad de péptidos en medio acuoso como su estructuración.

Para la realización de las medidas de dicroísmo circular me trasladé a los laboratorios del Dr. Fernando Díaz (CIB-CSIC).

En primer lugar se decidió evaluar el efecto de la concentración de TFE en agua sobre el grado de estructuración de los péptidos grapados, usando el isómero mayoritario del péptido grapado **2.06a** como modelo (Figura 2.23).

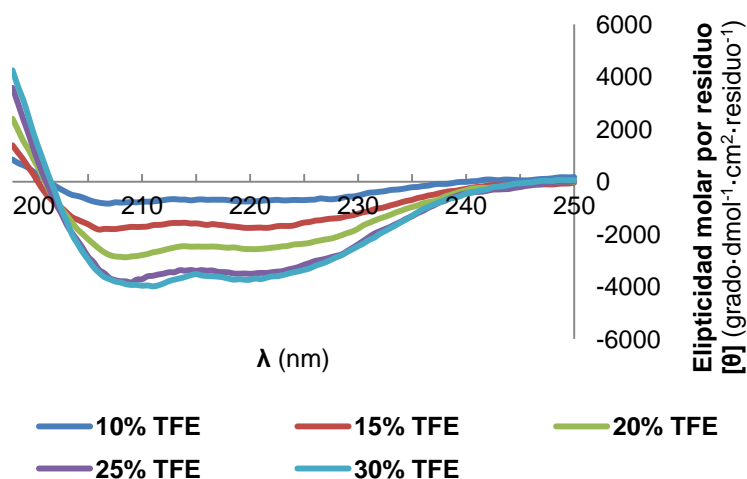


Figura 2.23 | Curvas de dicroísmo circular para el péptido **2.06a** a distintas concentraciones de TFE en agua a 25 °C.

Los valores de los espectros de dicroísmo circular se representan como elipticidad molar por residuo ($[\theta]$). Como se puede observar en la Figura 2.23, el péptido **2.06a** presenta ya a baja concentración de TFE (10% de TFE, línea azul oscura) un perfil propio de hélice α en disolución, con dos mínimos locales a 208 y 222 nm y un cambio a valores positivos sobre 202 nm. El incremento de la concentración de TFE en la disolución acuosa afecta positivamente a la estructuración de **2.06a**, pronunciándose el perfil de hélice α hasta una concentración del 30% de TFE, donde el efecto estructurante sería máximo y no se observaría variación significativa respecto a un 25% de TFE. Con todo ello, se escogió la concentración del 30% de TFE en agua para la adquisición de los espectros de dicroísmo circular del resto de los compuestos.

En la Figura 2.24 se recogen los espectros de dicroísmo circular para los péptidos **2.06a** (isómero mayoritario) y **2.06b** (isómero minoritario) de la grapa i,i+7, el péptido grapado **2.07** (i,i+4) y el péptido **2.09** (grapa saturada i,i+4) así

como del prototipo lineal **2.01** a 25 °C en disolución acuosa en presencia de un 30% de TFE. Mientras que el espectro de dicroísmo circular del prototipo lineal **2.01** muestra un perfil característico de péptido desestructurado (*random coil*), en todos los péptidos grapados **2.06-2.09** se observa claramente la estructura de hélice α .

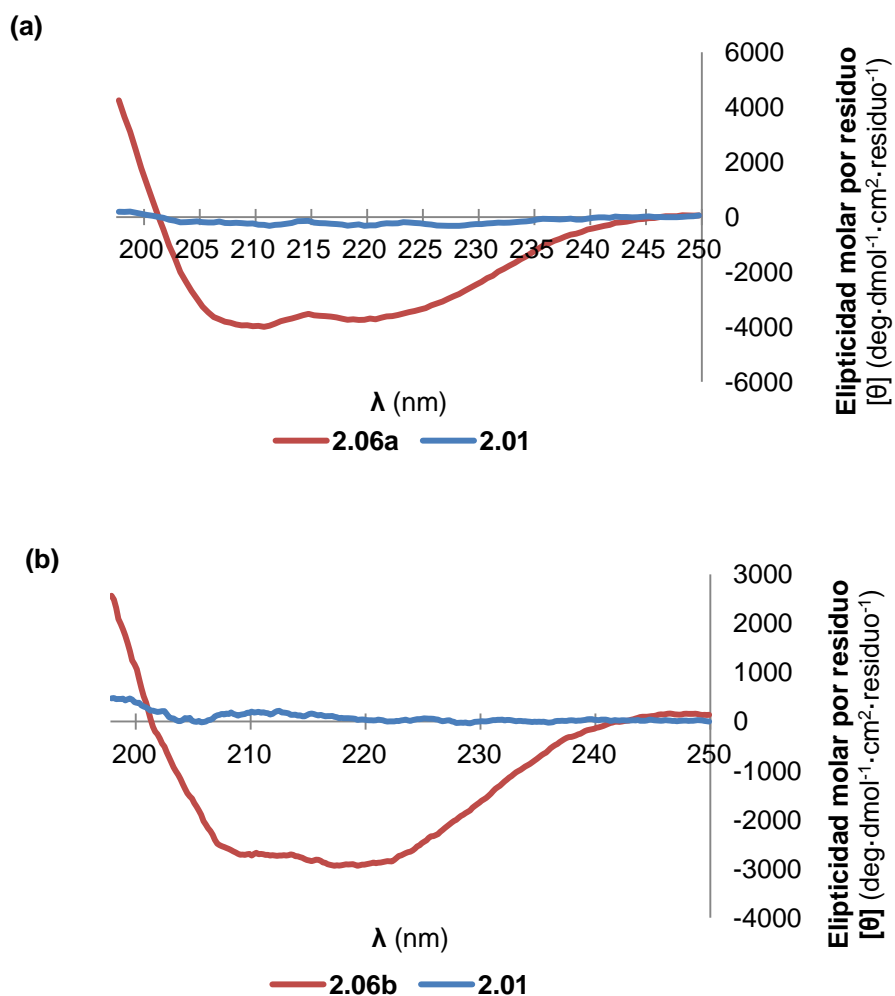
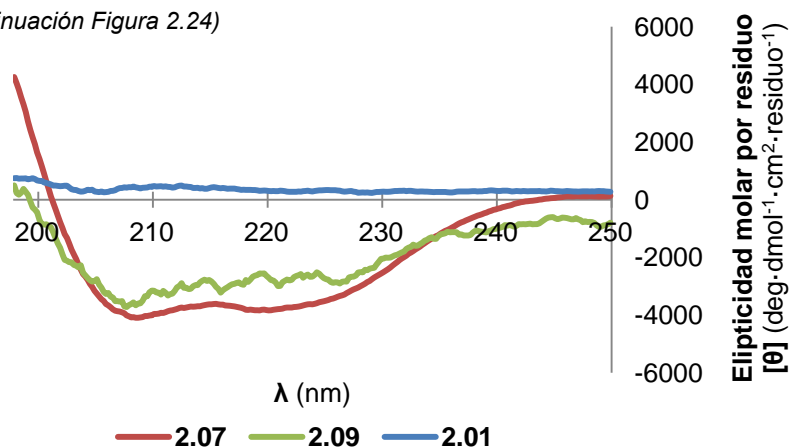


Figura 2.24 | Espectros de dicroísmo circular de los péptidos (a) **2.06a**, (b) **2.06b**, (c) **2.07** y **2.09** superpuestos con el del prototipo **2.01** en disolución acuosa con un 30% de TFE a 25 °C.

(c) (continuación Figura 2.24)



El porcentaje de helicidad α en péptidos pequeños se estimó haciendo uso de la ecuación descrita por Baldwin y colaboradores⁷⁴, que se define como el cociente entre la elipticidad molar por residuo observada a 222 nm en el espectro de dicroísmo circular ($[\theta]_{222}$) y la elipticidad molar máxima ($[\theta]_{\text{máx}}$), donde $[\theta]_{\text{máx}} = (-44000 + 250T)(1 - k/n)$, T es la temperatura en grados Celsius, k (factor de corrección lineal finita) es una constante que para péptidos pequeños adopta un valor de 4.0^{75} y n es el número de residuos. El valor calculado de $[\theta]_{\text{máx}}$ para los péptidos **2.06-2.09** (donde $n = 13$) es de $-26135 \text{ grados}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot\text{residuo}$. Los porcentajes de helicidad calculados se recogen en la Tabla 2.3⁷³.

Como se puede observar, mientras el péptido prototipo lineal **2.01** presenta una estructura desordenada al azar en disolución, los péptidos grapados aumentan considerablemente (dos órdenes de magnitud) su grado de helicidad experimental en disolución. Ahora bien, los valores alcanzados de helicidad son moderados (no superan el 20% en ninguno de los casos).

Tabla 2.3 | Elipticidad molar por residuo $[\theta]$ (deg cm² dmol⁻¹·residuo) a 222 y 208 nm, relación de helicidad a 222 y 208 nm y porcentaje de helicidad (%) de los péptidos grapados **2.06a**, **2.06b**, **2.07** y **2.09** en disolución acuosa con un 30% de TFE y a 25 °C.

	$[\theta]_{222}$	$[\theta]_{208}$	$[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$	Helicidad (%) [*]
2.01 (lineal)	275	437	0.63	< 0.1
2.06a	-3619	-3849	0.94	14
2.06b	-2575	-2310	1.10	12
2.07	-3739	-4043	0.93	14
2.09	-2802	-3657	0.77	11

^{*}Porcentaje de helicidad experimental determinado mediante el cociente de $[\theta]_{222}/[\theta]_{m\acute{a}x}$, donde se determinó $[\theta]_{m\acute{a}x} = -26135$ grado·dmol⁻¹·cm²·residuo⁻¹, según el procedimiento descrito por Baldwin y colaboradores⁷⁴.

De forma complementaria, y como un segundo criterio de helicidad, se señala también la relación entre los valores de elipticidad a 208 y 222 nm⁷⁶. Valores inferiores a 0.65, indicarían que el péptido no se encuentra estructurado como hélice α , mientras que valores comprendidos entre 1.25-1.75 son los esperables para hélices α ideales. En nuestro caso, los péptidos **2.06-2.09** presentan valores cercanos a 1.0, indicando que se encontrarían estructurados.

Por último, se llevó a cabo la comparación entre los datos de helicidad experimentales obtenidos por dicroísmo circular con los teóricos obtenidos mediante simulaciones de dinámica molecular empleados en el diseño inicial de los péptidos grapados **2.06a** y **2.07** (Figura 2.25). Como se puede observar, el grado de helicidad experimental observado en los espectros de dicroísmo circular de los péptidos grapados es ligeramente inferior al teórico. Esta variación, puede ser debida a las diferencias en las condiciones de simulación de dinámica molecular con las condiciones experimentales de CD, donde se empleó un 30% de TFE.

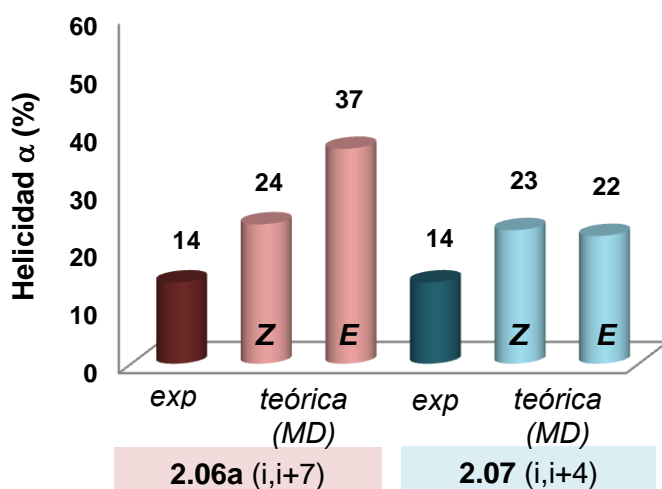


Figura 2.25 | Comparación entre los datos teóricos calculados con AMBER y los datos experimentales del grado de helicidad α obtenidos a partir de la Ec. de Baldwin en disolución para los péptidos **2.06a** (grapa i,i+7) y **2.07** (grapa i,i+4). Se indican los valores teóricos para los isómeros del doble enlace Z y E.

En conclusión, los estudios de dicróismo circular confirman que mientras que el péptido lineal prototipo **2.01** no está estructurado, mientras que en todos los péptidos grapados estudiados se observa un incremento significativo del carácter helicoidal, observándose una estructura de hélice α en todos los casos.

2.4.3.2. Estudios de RMN

Hasta ahora la estructura de los péptidos se ha estudiado globalmente por medio de dicróismo circular observándose diferencias significativas en la estructura secundaria de los péptidos conformacionalmente restringidos respecto al prototipo lineal. Para obtener información estructural a nivel atómico, y de forma complementaria a los estudios de dicróismo circular, se llevó a cabo un estudio conformacional en disolución mediante técnicas de RMN de los péptidos grapados *i,i+7* (**2.06a**, isómero mayoritario) y *i,i+4* (**2.07**, mezcla de isómeros) así como del prototipo lineal **2.01**, en colaboración con la Dra. M.^a Ángeles Jiménez (Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC).

La asignación completa de las señales de RMN para los núcleos de ^1H y ^{13}C , se llevó a cabo mediante el procedimiento estándar de asignación secuencial, basado en la adquisición de espectros bidimensionales homo- ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY y $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY) y heteronucleares ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC, $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC) de manera similar a la descrita en el Capítulo anterior. Todos los espectros se adquirieron en disolución acuosa con un 30% de TFE. Sin embargo, en el caso del péptido prototipo **2.01**, debido a la mala calidad de los espectros obtenidos en este disolvente, se decidió finalmente emplear DMSO- d_6 . Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de estos péptidos se encuentran recogidos en la Parte Experimental.

Para el cálculo de estructura o conjunto de estructuras que estuvieran de acuerdo con los datos experimentales observados en los espectros de RMN de estos péptidos, se siguió el procedimiento descrito en el Capítulo 1 de la presente Tesis doctoral. Se hizo uso del programa CYANA⁷⁷, el cual a partir de restricciones geométricas basadas en los espectros de RMN (restricciones de distancias, ángulos diedros y enlaces), permite obtener un conjunto de estructuras ordenadas según el grado de cumplimiento de dichas restricciones. Sin embargo, y a diferencia de los péptidos cíclicos del Capítulo 1, en este caso se pudo hacer uso del programa TALOS+⁷⁸ para determinar las restricciones de ángulos diedros (ϕ, ψ) en base a los desplazamientos químicos (δ) de ^1H , $^{13}\text{C}_\alpha$ y $^{13}\text{C}_\beta$ experimentales. Por otro lado, y con el fin de poder definir los péptidos en CYANA, se etiquetaron los residuos no naturales presentes en los péptidos (los residuos cuaternarios entre los que se establecen el cierre covalente y los residuos de Nle) como residuos naturales, los cuales son reconocidos por el programa. En concreto, los residuos derivados de (*L*)- α -(4'-pentenil)alanina (**2.02**) y (*L*)- α -(7'-octenil)alanina (**2.05**) se definieron como Lys y (*D*)-Lys, respectivamente. Los residuos de Nle se definieron también como Lys.

En la Figura 2.26 se muestran las 20 mejores estructuras calculadas en base a los datos de RMN del prototipo lineal **2.01**. Como se puede observar, este péptido no presenta una estructura ordenada en disolución, plegándose sus

extremos N- y C-terminal entre sí. En este sentido, en los NOEs observados en disolución de **2.01** destacan los picos de correlación de intensidad media observados entre residuos localizados en los extremos terminales opuestos del péptido. Estos resultados complementan lo observado en los espectros de dicroísmo circular, donde el péptido **2.01** no presentaba un perfil correspondiente a un péptido estructurado.

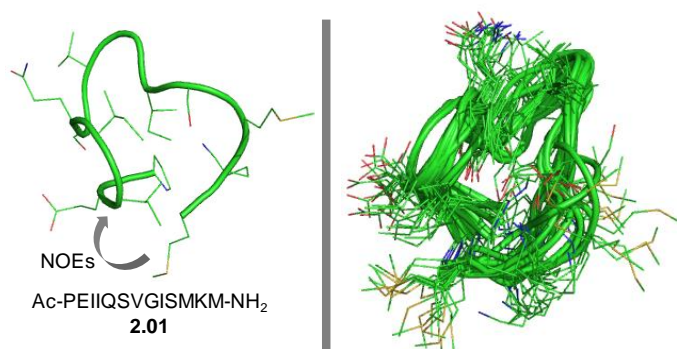


Figura 2.26 | Estructura promedio obtenida para **2.01** (izquierda) y superposición de las 20 mejores estructuras calculadas (derecha; valor de RMSD en la superposición del esqueleto peptídico de 0.89 ± 0.30 Å).

En contraste con el prototipo lineal, los péptidos conformacionalmente restringidos **2.06a** y **2.07** se estructuran en disolución como hélices α en los dos casos, como veremos a continuación. Los NOEs secuenciales más característicos de las hélices α son las señales de tipo $d\alpha N$ (distancia entre los protones $C\alpha H$ y los protones amídicos contiguos) y dNN (distancia entre los protones amídicos contiguos). Por otra parte, los NOEs no secuenciales más comunes son los acoplamiento espaciales entre los protones amídicos separados por un paso de vuelta de hélice ($d\alpha N_{(i,i+3)}$) y entre los protones $C\alpha H$ y los protones β a tres residuos ($d\alpha\beta_{(i,i+3)}$). La forma típica de representar los NOEs es mediante el denominado resumen de NOEs. En la Figura 2.27 y 2.28 se representan los resúmenes de NOEs para los péptidos grapados **2.06a** y **2.07** y detalles de los espectros $^1H, ^1H$ -NOESY. A diferencia del péptido lineal prototipo, en ambos

péptidos cíclicos sí se observan señales de NOEs típicas de hélices α , presentando un mayor número de señales el péptido **2.06a** (i,i+7).

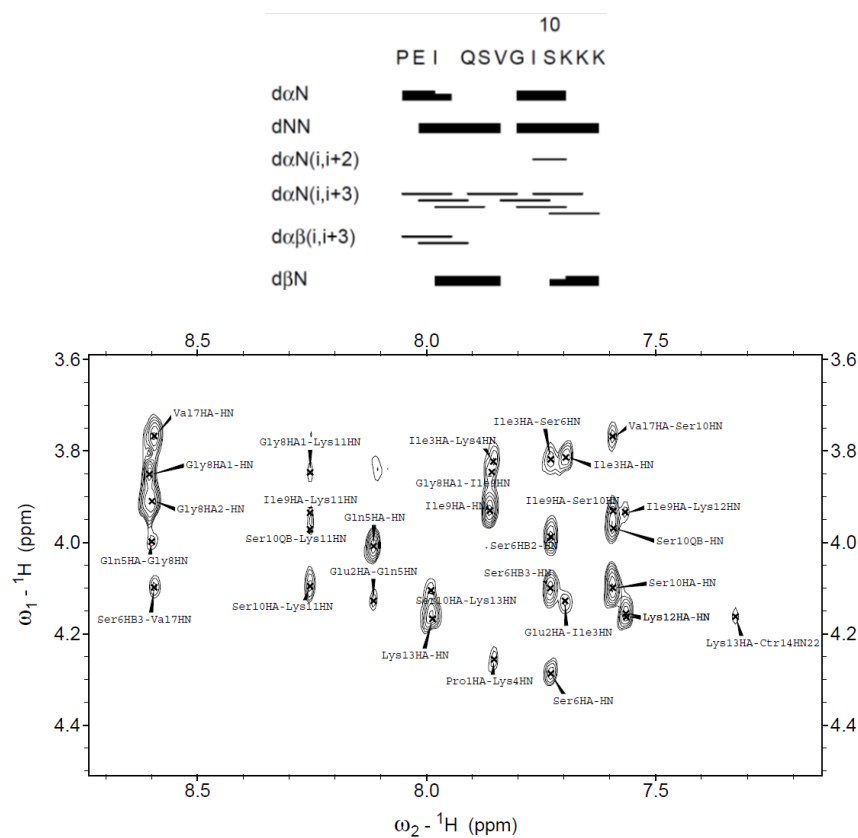


Figura 2.27 | Resumen de NOEs para **2.06a** y detalle de la región de los protones $\text{C}\alpha\text{H}$ y HN observados en el espectro de ^1H , ^1H -NOESY.

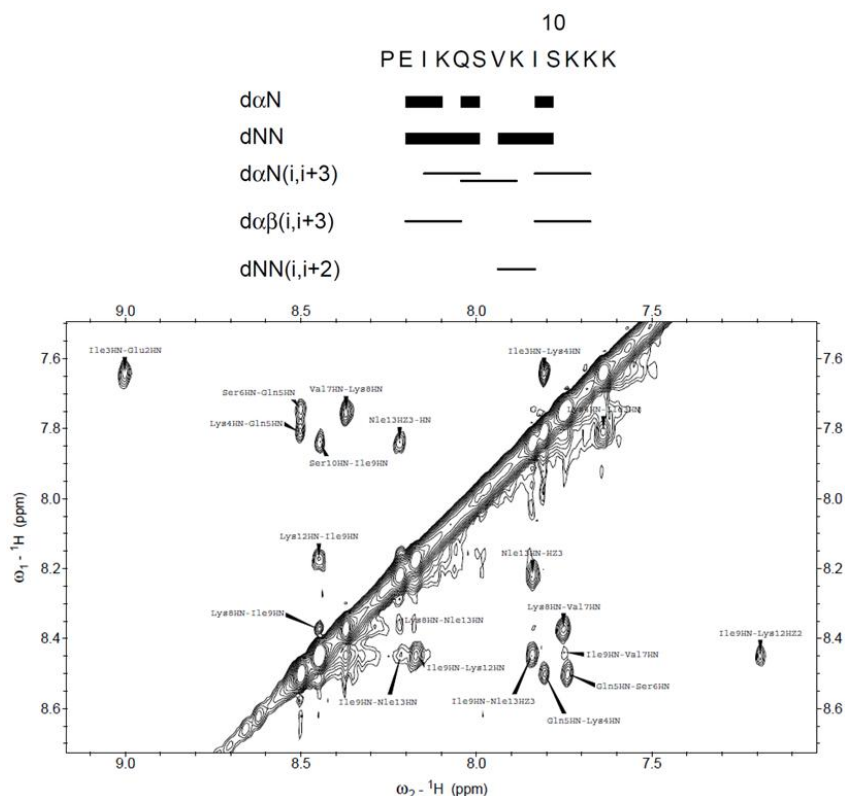
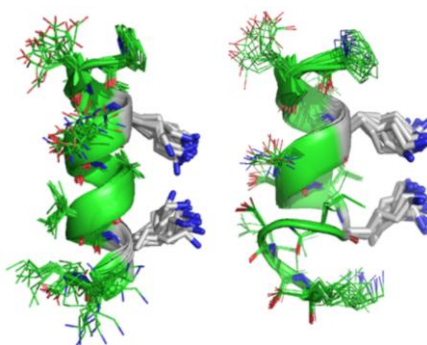


Figura 2.28 | Resumen de NOEs para **2.07** y detalle de la región de los protones C α H y HN observados en el espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY.

En la Tabla 2.4 se refleja la superposición de las 20 mejores estructuras calculadas para los péptidos grapados **2.06a** y **2.07**, así como un resumen de los datos utilizados para el cálculo de estructura y valor de RMSD de los péptidos grapados y el prototipo lineal **2.01**.

Aunque ambos péptidos cíclicos se estructuran en forma helicoidal, se observaron diferencias significativas entre las estructuras de ambos péptidos. Así, el péptido cíclico **2.06a** (isómero mayoritario de la grapa i,i+7) presenta una estructuración más homogénea a lo largo de toda la hélice mientras que el péptido **2.07** (grapa i,i+4) pierde la estructuración como hélice α en el extremo C-terminal.

Tabla 2.4 | Superposición de las 20 mejores estructuras calculadas para **2.06a** (izquierda) y **2.07** (derecha) y datos estadísticos del cálculo de estructura. Se marcan en gris los residuos donde se encuentra el cierre covalente.



parámetros	péptidos		
	2.01*	2.06a**	2.07**
Restricciones de distancia debidas a señales NOE	25	46 (1 por cierre covalente)	52 (1 por cierre covalente)
Restricciones de ángulos diedros	14	20	18
Violaciones de restricciones:			
- de distancia	ninguna	ninguna	ninguna
- de ángulos	ninguna	ninguna	ninguna
Valores medidos de RMSD, Å			
cadena principal	0.89 ± 0.30	0.33 ± 0.09	0.18 ± 0.06
todos los átomos pesados	1.66 ± 0.45	1.16 ± 0.16	0.86 ± 0.12

*Espectros de RMN adquiridos en DMSO- d_6 . **Espectros de RMN adquiridos en disolución acuosa con un 30% de TFE.

Finalmente, en la Figura 2.29 se recoge la superposición de las dos mejores estructuras calculadas con el programa CYANA para los péptidos **2.06a** y **2.07** con la hélice definida por los residuos Pro435-Met447 de la proteína nativa. Aunque los dos péptidos se estructuran como hélices α y orientan las cadenas laterales de sus residuos como ocurre en la hélice de la proteína nativa, el péptido conformacionalmente restringido **2.06a** (grapa i,i+7) se superpone mejor con la hélice parental que **2.07** (grapa i,i+4), ya que en este último la presencia del cierre covalente parece combar levemente la hélice, quedando el extremo C-terminal desplazado levemente.

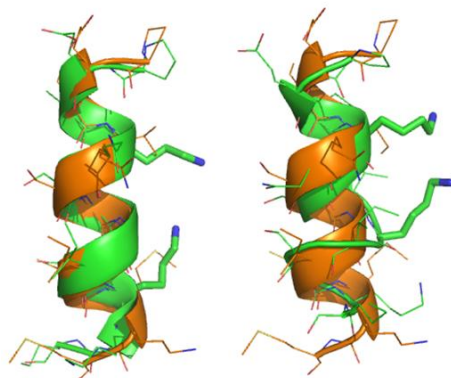


Figura 2.29 | Superposición de dos mejores estructuras calculadas con CYANA de **2.06a** (izquierda) y **2.07** (derecha) en verde, con la hélice α presente en la TryR nativa (naranja, 2jk6).

En conclusión, y al igual que se observaba en los estudios de dicroísmo circular anteriormente mencionados, la introducción de un cierre covalente entre dos residuos presentes en la secuencia peptídica de **2.06a** ($i,i+7$) y **2.07** ($i,i+4$) ha permitido que se estructuren en forma de hélice α en disolución acuosa en ausencia del entorno de la proteína, a diferencia del péptido prototipo lineal **2.01**, que en estas condiciones está desestructurado. En los estudios de RMN se observa una mejor estructuración cuando el cierre covalente se introduce entre residuos situados a dos pasos de vuelta de hélice (**2.06a**) que entre residuos situados a un solo paso de vuelta (**2.07**).

Todos estos resultados validan nuestra hipótesis inicial de trabajo en la que un aumento de la restricción conformacional supondría una mayor estructuración en forma de hélice α .

2.5. Serie 2. Análogos lineales de 2.01 (2.30-2.35)

2.5.1. Diseño

De forma paralela y complementaria a la serie anterior (péptidos *grapados*), y con el fin de optimizar la actividad del péptido lineal **2.01**, nos propusimos la preparación de una segunda serie de análogos lineales con modificaciones en distintos residuos de la secuencia (Figura 2.30), atendiendo a diversos factores que se comentan a continuación.

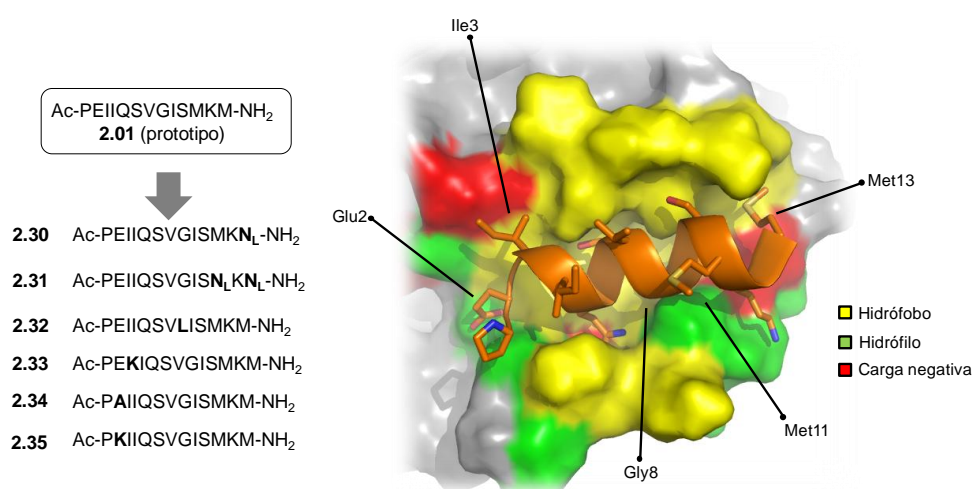


Figura 2.30 | (Izquierda) Estructura de los péptidos lineales objetivo (2.30-2.35); (derecha) detalle del prototipo 2.01 (naranja) sobre el dominio de dimerización de la TryR (gris). Se marcan en colores la naturaleza estereoelectrónica de los residuos presentes en la proteína. N_L = norleucina.

En primer lugar decidimos preparar los péptidos lineales **2.30** (Met13Nle) y **2.31** (Met11Nle+Met13Nle) en los que se sustituyeron una o ambas Met por residuos hidrófobos similares de Nle que no presentan problemas de oxidación con el fin de mejorar la estabilidad química del péptido prototipo **2.01**.

En segundo lugar nos planteamos la sustitución del residuo de Gly8 de **2.01** por un residuo hidrófobo de Leu (péptido **2.32**, Gly8Leu) ya que en el estudio teórico previo de helicidad, se había observado que este residuo suponía un punto de pérdida de estructura secundaria. Además, si se analiza el modelo de

interacción propuesta del péptido lineal **2.01** con el monómero de la Li-TryR (Figura 2.30), la introducción de un residuo hidrófobo en esta posición podría permitir nuevas interacciones hidrofóbicas con los residuos Val441' y Leu468' del otro monómero.

En tercer lugar, consideramos interesante sustituir el residuo Ile3 por un residuo de Lys (péptido **2.33**, Ile3Lys), con el fin de establecer una posible interacción con los residuos cercanos al Glu436' de la otra subunidad. Además, la sustitución de un residuo hidrófobo por otro cargado positivamente podría tener efectos beneficiosos en la solubilidad de los péptidos, ya que la estimación teórica del punto isoelectrico del prototipo **2.01**⁷⁹ indica que a pH fisiológico el péptido **2.01** se encontraría con carga neta cero.

Como se había comentado en los Antecedentes, el Glu436 era un residuo crítico para la estabilidad del dímero de la Li-TryR, y por ende, para su actividad enzimática. Con el fin de evaluar la importancia del residuo Glu2 en la actividad de **2.01**, nos propusimos la sustitución del Glu2 por una Ala (péptido **2.34**, Glu2Ala).

Finalmente, y teniendo en cuenta que la enzima es un homodímero simétrico, donde la hélice α en la que se encuentra localizado el Glu436 interacciona de forma paralela con su hélice análoga del otro monómero (Glu436 y Glu436' están próximos), decidimos reemplazar el residuo de Glu de la posición 2 del prototipo por un residuo de Lys (péptido **2.35**, Glu2Lys) con el fin de evaluar la importancia de una posible interacción con el Glu436' de la otra subunidad de la enzima en la actividad de dicho péptido.

2.5.2. Síntesis

La preparación de los péptidos lineales propuestos **2.30–2.35** se llevó a cabo mediante síntesis manual en fase sólida siguiendo protocolos similares a los descritos en el capítulo anterior de esta tesis. Se utilizó una resina de tipo MBHA con espaciador amida Rink (0.047 mmol/g) y como agente de acoplamiento se empleó HCTU en combinación con DIEA como base. Las reacciones de

acoplamiento se monitorizaron mediante el test de Kaiser o mediante análisis por HPLC-MS de pequeñas muestras de desanclaje de la resina.

En la Figura 2.31 se recoge la estrategia de síntesis divergente en paralelo que se ha empleado en la preparación de los péptidos lineales objetivo propuestos.

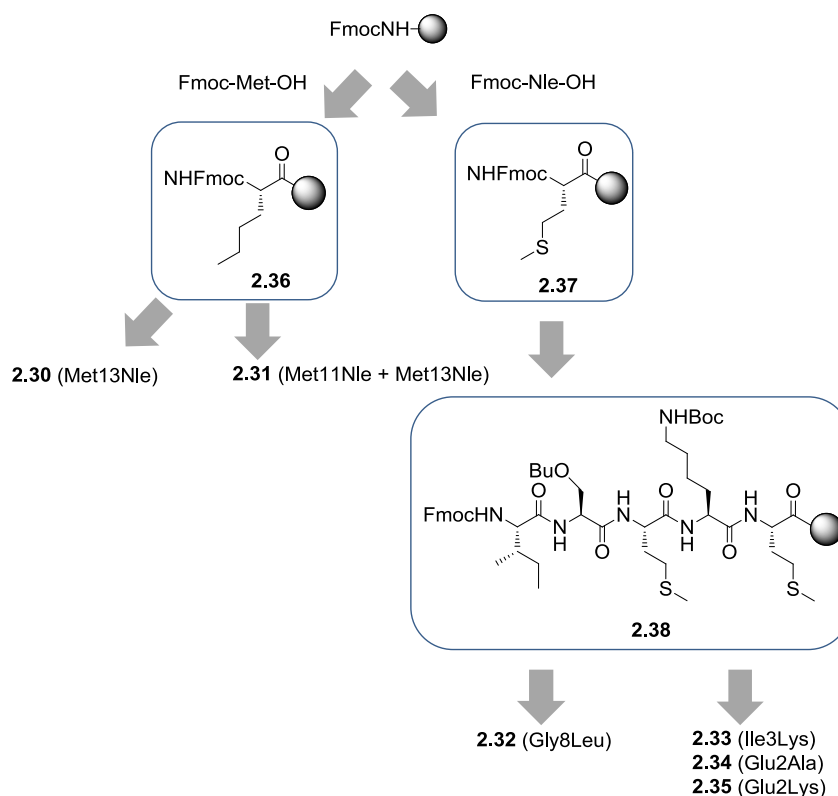


Figura 2.31 | Estrategia de síntesis divergente en paralelo de los péptidos **2.30-2.35**.

La síntesis comenzó con el anclaje a la resina de Fmoc-Met-OH o Fmoc-Nle-OH como primer aminoácido, a temperatura ambiente durante toda una noche, para dar lugar a las peptidil-resinas **2.36** y **2.37** (Figura 2.31). En los dos casos, y tras determinar la carga de ambas resinas, se llevó a cabo una síntesis divergente en paralelo de los péptidos lineales **2.30-2.35**, dividiendo físicamente la peptidil-resina en tres puntos determinados de la ruta sintética. A continuación se

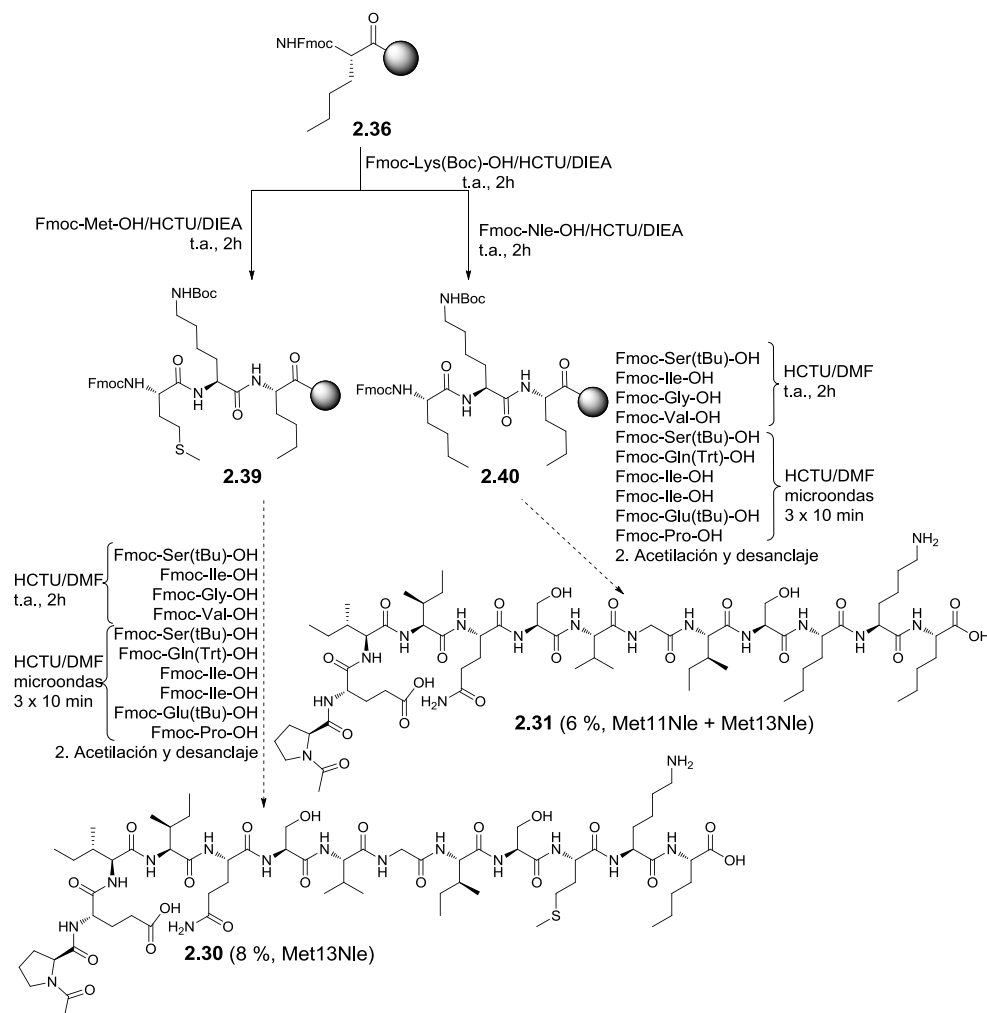
detalla la síntesis los péptidos lineales objetivo, agrupados en base a la división inicial de la peptidil-resina.

2.5.2.1. Síntesis de los péptidos **2.30** y **2.31** a partir de la peptidil-resina **2.36**

La síntesis comenzó con la preparación de las tripeptidil-resinas **2.39** y **2.40** a partir de **2.36** con la introducción secuencial de Fmoc-Lys(Boc)-OH, división de la peptidil-resina seguido de la introducción de Fmoc-Met-OH o Fmoc-Nle-OH, respectivamente (Esquema 2.10). La elongación posterior de las peptidil-resinas se llevó a cabo empleando HCTU/DIEA en DMF a temperatura ambiente durante 2 h. Al igual que para la síntesis de la serie 1, se empleó una mezcla de piperidina:DBU:DMF, 1:1:48 (en volumen) para la desprotección del extremo N-terminal como paso previo a cada acoplamiento aminoacídico. Cabe resaltar dos aspectos en la síntesis de los péptidos **2.30** y **2.31**. En primer lugar, se observó que una vez introducida la Gly8, la introducción de la Ser9 a temperatura ambiente necesitó de tiempos de reacción largos (toda una noche) y el empleo de un mayor número de equivalentes de reactivos. Basándonos en referencias bibliográficas que utilizaban irradiación de microondas para el acoplamiento de Boc/Fmoc aminoácidos en fase sólida⁸⁰, decidimos emplear tres ciclos de 10 min a 40 °C en microondas usando en cada ciclo Fmoc-AA-OH (1.2 eq.) y HCTU (1.2 eq.) y DIEA (2.4 eq.) en la mínima cantidad de DMF posible (método C de acoplamiento en la Parte Experimental). Cabe resaltar que tiempos menores de reacción (cinco minutos por acoplamiento usando irradiación de microondas) resultaron insuficientes. Este nuevo protocolo nos permitió completar las reacciones de acoplamiento y reducir los tiempos de reacción.

Finalmente, se llevó a cabo la acetilación del extremo N-terminal y el tratamiento acidolítico adecuado para desanclar los péptidos de la resina. Cabe señalar que la presencia de un residuo de Met en el péptido **2.30** supuso incorporar bromuro de trimetilsilo (TMSBr) y 1,2-etanoditiol (EDT) como agentes reductores⁸¹ en la mezcla acidolítica para evitar la oxidación del residuo de Met en el medio ácido (ver Parte Experimental). Los crudos finales se purificaron por cromatografía en fase reversa en un sistema de media presión (Biotage), lo que

permitió acceder a los péptidos objetivo **2.30** (Met13Nle) y **2.31** (Met11Nle+Met13Nle), con unos rendimientos globales del 6 y del 8%, y purezas del 88 y 90%, respectivamente.



Esquema 2.10 | Síntesis de los péptidos **2.30** y **2.31**, portadores de residuos de Nle.

2.5.2.2. Síntesis de los péptidos **2.32-2.35** a partir de la peptidil-resina **2.37**

La síntesis de los péptidos **2.32-2.35** portadores de residuos de Met se realizó a partir de la peptidil-resina **2.37** de manera similar a la descrita en el

apartado anterior haciendo uso de irradiación de microondas en las etapas de acoplamiento (Esquema 2.11). En primer lugar se elongó la secuencia peptídica hasta la síntesis del pentapéptido anclado a la resina **2.38**. A partir de este punto se dividió la resina en dos partes. Una parte se utilizó para sintetizar el péptido objetivo **2.32** (Gly8Leu). Para ello se hizo reaccionar **2.38** con Fmoc-Leu-OH, seguido de la incorporaron secuencial el resto de aminoácidos, acetilación del extremo N-terminal y desanclaje del péptido de la resina mediante tratamiento acidolítico en condiciones reductoras. El crudo final se purificó por cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage, lo que permitió aislar el péptido **2.32** (Gly8Leu) con un rendimiento global del 8% y una pureza del 88%.

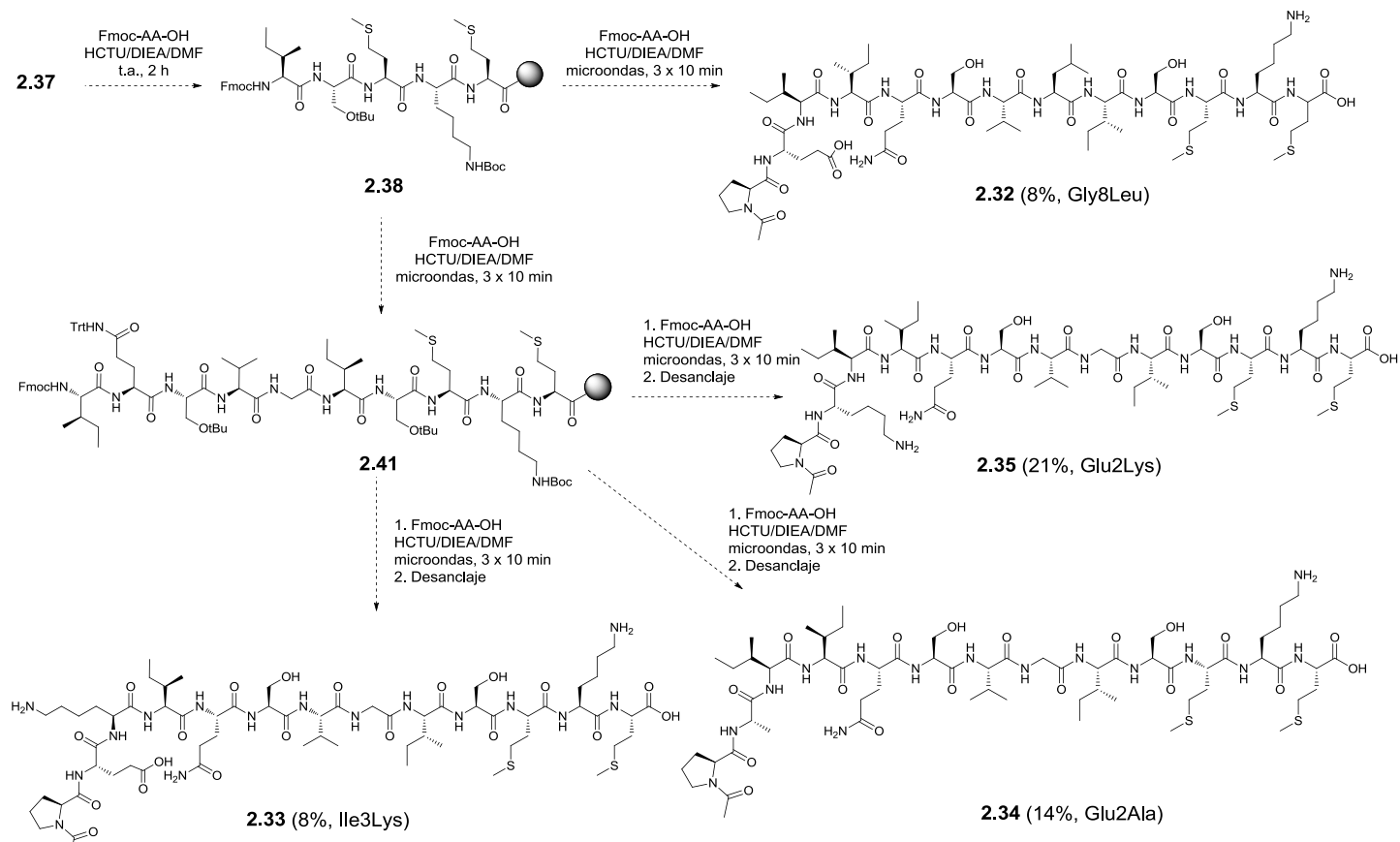
La preparación de los péptidos **2.33-2.35** se llevó a cabo siguiendo una estrategia similar a partir de la otra porción de peptidil-resina **2.38**, elongando la secuencia hasta la síntesis del decapeptido **2.41** dividiendo la resina en este punto en tres partes. En la Tabla 2.5 se recogen los datos analíticos y rendimientos globales de los péptidos lineales sintetizados.

Tabla 2.5 | Datos analíticos y rendimientos globales de **2.30-2.35**

<i>Péptido</i>	<i>Fórmula molecular</i>	<i>Masas exactas</i>	<i>m/z obs.</i>	<i>t_R (min)*</i>	<i>Pureza*</i>	<i>Rto. global (%)</i>
2.30	C ₆₅ H ₁₁₄ N ₁₆ O ₁₉ S ₂	1454.8167	728.4160	6.74	90	6
2.31	C ₆₆ H ₁₁₆ N ₁₆ O ₁₉	1436.8603	1437.8623	6.99	90	8
2.32	C ₆₄ H ₁₁₃ N ₁₇ O ₁₉ S ₂	1487.7840	1488.7949	5.10	> 90	8
2.33	C ₆₈ H ₁₂₀ N ₁₆ O ₁₉ S ₂	1528.8357	765.4377	8.28	88	8
2.34	C ₆₂ H ₁₁₀ N ₁₆ O ₁₇ S ₂	1414.7676	1415.7787	8.88	> 90	14
2.35	C ₆₅ H ₁₁₇ N ₁₇ O ₁₇ S ₂	1471.8255	1472.8341	6.03	95	21

*Medido en HPLC analítico a 217 nm.

En todos los casos, los péptidos **2.30-2.35** se obtuvieron con una pureza analítica en HPLC igual o superior al 90%. En el caso del péptido **2.32** (Gly8Leu), su gran insolubilidad planteó ciertos problemas en la purificación del mismo, no consiguiéndose purezas superiores al 88%.



Esquema 2.11 | Síntesis de los péptidos lineales **2.32-2.35** portadores de residuos de Met.

2.6. Evaluación biológica

Los compuestos sintetizados en este Capítulo de la Tesis han sido evaluados como inhibidores de la actividad y del proceso de la dimerización de la Tripanotión Reductasa de *L. infantum* en el grupo del Prof. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá de Henares.

2.6.1. Inhibición de la actividad de la Li-TryR

La inhibición de la actividad de la Li-TryR por parte de los péptidos sintetizados se llevó a cabo mediante la medida de la actividad oxidorreductasa de la Li-TryR en presencia de los distintos péptidos a evaluar, según el ensayo enzimático descrito por Hamilton y colaboradores⁸² (ver Parte Experimental). La medida de la concentración de producto de la reacción enzimática (tripanotión reducido, $T(SH)_2$) se lleva a cabo de forma indirecta midiendo espectroscópicamente (a 412 nm) la concentración de ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico (TNB) que se genera tras ser reducido por el $T(SH)_2$ (Figura 2.32). La concentración de TNB es directamente proporcional a la concentración de producto de reacción, y además, la gran ventaja de este método es la gran sensibilidad que presenta debido al coeficiente de extinción molar del TNB.

La medida de la inhibición de la actividad de la enzima se realiza incubando la misma en presencia de distintas concentraciones de péptidos (previamente disueltos en pequeñas cantidades de DMSO) siguiendo el curso de la reacción catalítica durante 60 min. La actividad inhibitoria se expresa como porcentaje de inhibición (%) sobre la actividad de la enzima.

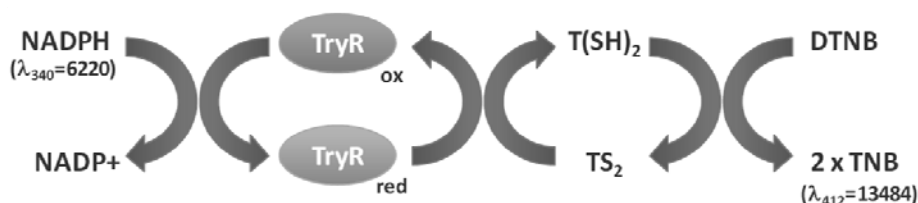


Figura 2.32 | Ensayo enzimático para la determinación de la actividad de la TryR.

Serie 1: péptidos conformacionalmente restringidos

En la Figura 2.33 se muestran los datos de reducción de la actividad oxidorreductasa de la TryR (7 nM) en presencia de los péptidos conformacionalmente restringidos (**2.06a,b-2.09**) a una concentración de 25 μ M. También se incluye el prototipo **2.01**, así como, un control en ausencia de péptidos (DMSO).

Como se puede observar en los péptidos grapados entre dos pasos de vuelta (i,i+7) **2.06a**, **2.06b** y **2.08**, se observa una disminución en los valores de inhibición de la enzima respecto al prototipo. Sin embargo, los péptidos grapados a través de un cierre más corto (i,i+4), igualan (**2.07**) o mejoran (**2.09**) la actividad inhibitoria.

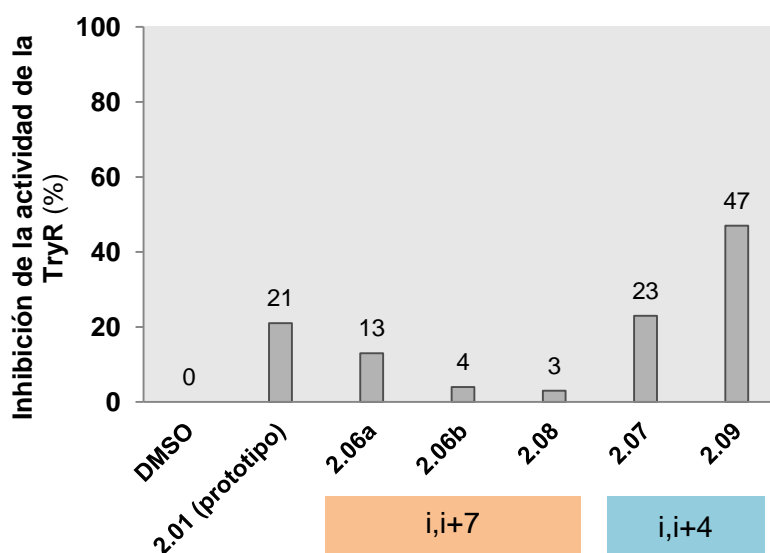


Figura 2.33 | Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de la Li-TryR (7 nM) en presencia de los péptidos conformacionalmente restringidos (25 μ M).

En base a estos datos, el aumento de restricción conformacional mediante un cierre entre residuos 4 y 11 separados por dos pasos de vuelta (i,i+7) en los péptidos **2.06a,b** y **2.08** disminuye la inhibición de la Li-TryR con respecto al prototipo **2.01**. Sin embargo, el cierre covalente entre los residuos 4 y 8 (un paso

de vuelta de hélice; $i, i+4$) presente en los péptidos **2.07** y **2.09** no penalizaría la capacidad inhibitoria de los péptidos, obteniéndose en el caso del péptido grapado saturado **2.09** (47%) un aumento en la actividad inhibitoria respecto al prototipo lineal **2.01** (21%).

Serie 2: análogos lineales

En cuanto a la actividad de los análogos lineales **2.30-2.35**, en la Figura 2.34 se muestran los porcentajes de inhibición de la actividad oxidorreductasa de la TryR a una concentración 25 μ M de péptido. También se incluye el prototipo **2.01**, así como, un control en ausencia de péptidos (DMSO).

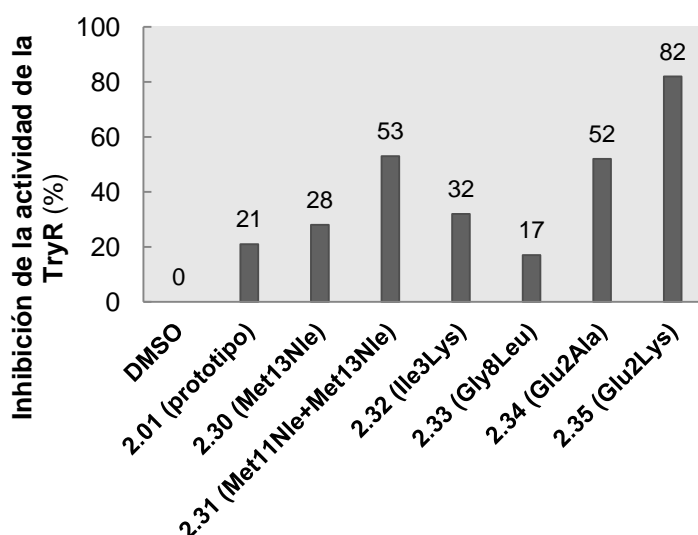


Figura 2.34 | Porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de la Li-TryR (7 μ M) en presencia de los análogos lineales de **2.01** (25 μ M).

En primer lugar se puede observar que la sustitución de residuos de Met por Nle es beneficiosa en la actividad inhibitoria de los péptidos. Así, la sustitución de los dos residuos de Met por Nle (**2.31**) se traduce en un aumento significativo de la actividad inhibitoria de un 21 a un 53% respecto al prototipo. Sin embargo, la sustitución de la Met13 por Nle (**2.30**) da lugares a valores de actividad inhibitoria

similares al prototipo lo que sugiere que el cambio a Nle11 podría ser más importante para la actividad que el cambio a Nle13.

En este punto, cabe señalar que en los péptidos grapados **2.07** y **2.09** (i,i+4) se incorporaba el cierre covalente entre los residuos 4 y 8, estando presentes en los dos casos los residuos de Nle terminales. Sin embargo, en el péptido grapado **2.06a,b** y **2.08** (i,i+7) el cierre covalente se introduce entre los residuos 4 y 11, lo que implica la sustitución de la Nle11, por el correspondiente aminoácido cuaternario. Podría pensarse entonces, que la mayor actividad observada en **2.07** y **2.09** (i,i+4) respecto a **2.06a,b** y **2.08** (i,i+7) (Figura 2.33) y al prototipo lineal **2.01** es debida a la presencia de los dos residuos de Nle (y especialmente a la Nle11) en el primero de los casos y no a un efecto beneficioso del cierre covalente en la actividad, ya que la actividad de **2.09** (47%) es similar a la del correspondiente péptido lineal **2.31** (53%).

En segundo lugar, la sustitución del residuo de Gly8 por Leu (**2.33**) para no romper la estabilidad helicoidal en este punto de la secuencia, no supone una mejora de la actividad inhibitoria de la Li-TryR respecto al prototipo **2.01**.

En tercer lugar, la sustitución del residuo de Ile3 por el residuo básico de Lys (**2.32**) da lugar a un ligero aumento en la actividad inhibitoria con respecto al péptido prototipo **2.01** (32% frente a un 21%).

Por último, se recogen los valores de actividad inhibitoria de los análogos de **2.01** donde se ha sustituido el residuo de Glu2 por Ala (péptido **2.34**, *scanning* de Ala), y por Lys (péptido **2.35**). La actividad inhibitoria de estos dos péptidos aumenta con respecto al prototipo **2.01**. Destaca la actividad mostrada por el péptido **2.35** (Glu2Lys) con unos valores de inhibición del 82% marcadamente superiores al valor observado en el prototipo **2.01** (21%), siendo **2.35** el compuesto más activo de los sintetizados hasta el momento.

Seguidamente decidimos permutar de manera aleatoria la secuencia original del péptido **2.35** para ensayar un péptido *scrambled* como control negativo. Se seleccionó un péptido de secuencia Ac-Lys-Ile-Ile-Pro-Lys-Val-Gln-

Gly-Met-Ser-Ile-Met-Ser-NH₂ (**2.42**), secuencia que se generó de manera aleatoria con el programa GenScrip⁸³. Cabe destacar que el péptido **2.42** resultó inactivo, lo que indica que la actividad observada para **2.35** es específica de la secuencia.

Finalmente, se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) para el péptido lineal **2.35** más activo de la serie, que se define como la concentración de péptido para la cual se reduce al 50% la actividad de la TryR en las condiciones de ensayo. Para ello, se llevó a cabo el ensayo de actividad oxidorreductasa anteriormente descrito, incubando la enzima (7 µM) en presencia de distintas concentraciones del péptido (0.3 a 75.0 µM). Los valores de IC₅₀ se calcularon a partir de las pendientes de las curvas en los primeros 20 minutos de ensayo, repitiendo cada experimento tres veces. En estas condiciones, el valor de IC₅₀ medio obtenido para **2.35** fue de 1.8 ± 0.3 µM.

Por último, se han llevado a cabo ensayos para determinar el mecanismo cinético de inhibición de la actividad de la Li-TryR por parte del péptido **2.35**. Según los datos preliminares, el comportamiento inhibitorio mostrado por el péptido **2.35** es complejo, y difícil de caracterizar cinéticamente, presentando una cinética de unión lenta (*slow binding*).

2.6.2. Inhibición de la dimerización de la Li-TryR

El efecto de los péptidos sobre la dimerización de la TryR se evaluó con un ensayo de tipo ELISA implementado en el laboratorio del Dr. Antonio Jiménez³⁵ (Figura 2.35) y que está inspirado en el método descrito por Sluis-Cremer y colaboradores para la determinación de inhibidores de la dimerización de la TI del VIH-1⁸⁴. La técnica empleada consiste en marcar la Li-TryR silvestre con dos moléculas señalizadoras distintas: un FLAG-*tag* y un HIS-*tag*. Cuando este heterodímero (HIS/FLAG-TryR) se incubaba en una placa tapizada con un anticuerpo *anti*-FLAG, la enzima se retiene de forma específica sobre ésta. Ahora bien, si se incubaba la enzima sobre la misma placa pero ahora en presencia de los potenciales péptidos inhibidores, en aquellos casos en los que los péptidos afecten a la estabilidad de los heterodímeros, la población de heterodímero fijado sobre la

placa será menor. La cantidad de heterodímero fijado se detecta mediante un ensayo de tipo ELISA. Así, cuanto mayor sea el efecto inhibitorio de la dimerización de la enzima, menor es la señal ELISA registrada. La actividad de los péptidos evaluados se expresa como porcentaje de inhibición (%) de la dimerización de la enzima.

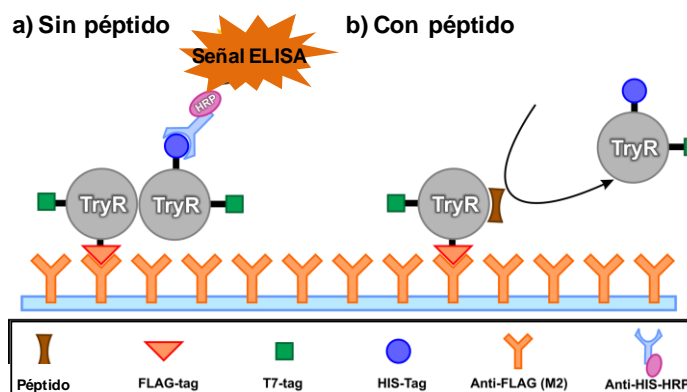


Figura 2.35 | Ensayo ELISA para la determinación del efecto de los péptidos en el proceso de la dimerización de la TryR.

Serie 1: péptidos conformacionalmente restringidos

En la Figura 2.36 se muestran los datos de inhibición de la dimerización de la TryR en presencia de los péptidos conformacionalmente restringidos y del prototipo **2.01** como control positivo. Los ensayos se realizaron a una concentración de 15 μ M de péptido. El control se ha realizado en ausencia de péptidos, añadiendo en su lugar sólo DMSO.

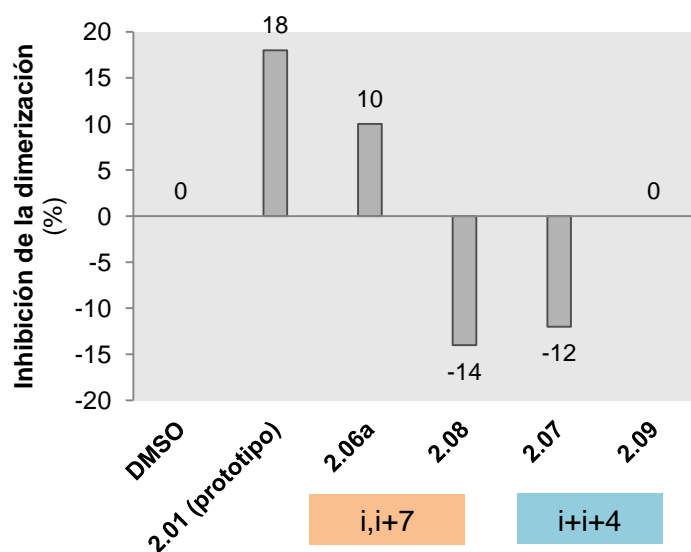


Figura 2.36 | Inhibición de la dimerización de la Li-TryR (400 nM) de los péptidos grapados **2.06a**, **2.07**, **2.08** y **2.09** (15 μ M).

Como se observa en la figura anterior, la mayoría de los péptidos conformacionalmente restringidos evaluados (**2.06a**, **2.07**, **2.08** y **2.09**) no son capaces de inhibir la dimerización de la enzima a la concentración de péptido ensayada (15 μ M) de una forma significativa. Únicamente en el péptido **2.06a** (i,i+7), se observa un 10% en la inhibición en la formación de heterodímero. Es más, en algunos de los péptidos se observan efectos de incremento en la señal de heterodímero detectada (péptidos **2.07** (i,i+7) y **2.08** (i,i+4)). No se observa una correlación clara entre los datos de actividad y de dimerización.

Serie 2: análogos lineales

En la Figura 2.37 se recogen los resultados obtenidos en el ensayo de dimerización para los péptidos lineales **2.31** (Met11Nle+Met13Nle) y **2.35** (Glu2Lys, que había resultado el más activo en el ensayo de inhibición de la actividad oxidorreductasa). Asimismo, se incluyeron el péptido prototipo **2.01** y el péptido *desordenado* **2.42** como controles.

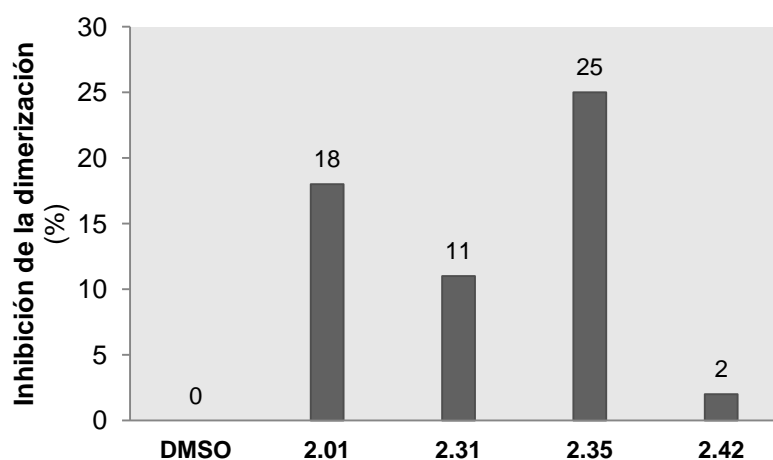


Figura 2.37 | Inhibición de la dimerización de la Li-TryR (400 nM) de los péptidos lineales **2.01** (prototipo), **2.31** (Met11Nle+Met13Nle), **2.35** (Glu2Lys) y **2.42** (scrambled) (11.8 μ M). Tiempo de incubación de 12 h.

Los resultados indican que ambos péptidos **2.31** y **2.35** son capaces de inhibir la dimerización de la enzima. La sustitución de los dos residuos de Met por Nle en **2.31** da lugar a una ligera disminución de la inhibición de la dimerización de la TryR, cuando se compara con el prototipo **2.01** mientras que el péptido **2.35** (Glu2Lys) da lugar a un porcentaje de inhibición de la dimerización superior (25%) en las condiciones de ensayo. Asimismo, se observa cómo el péptido *desordenado* **2.42** no afecta a la dimerización de la enzima, lo que confirmaría que el efecto observado es específico de la secuencia.

Por último, se determinaron los valores de IC_{50} de la inhibición de la dimerización de los péptidos anteriormente comentados. El IC_{50} se define como la concentración de péptido necesaria para inhibir la formación de un 50% del heterodímero de Li-TryR, en las condiciones de ensayo. En la Tabla 2.6 se recogen los valores de IC_{50} determinados para los péptidos **2.31** (Met11Nle+Met13Nle) y **2.35** (Glu2Lys), así como del prototipo **2.01**. Se emplearon unas concentraciones de inhibidores de 12, 23, 47 y 94 μ M.

Tabla 2.6 | IC₅₀ de inhibición de dimerización de la TryR de los péptidos **2.31**, **2.35** y del prototipo **2.01**.

Péptido	Secuencia	IC ₅₀ (μM)*
2.01 (prototipo)	Ac-PEIIQSVGISMKM-NH ₂	41.6 ± 4.0
2.31 (Met11Nle+Met13Nle)	Ac-PEIIQSVGISNleKNle-NH ₂	44.7 ± 5.4
2.35 (Glu2Lys)	Ac-PKIIQSVGISMKM-NH ₂	17.9 ± 0.6

*Datos determinados de las pendientes de la curva tras 20 min. Los ensayos se realizaron hasta 60 min.

Como puede observarse, los valores de IC₅₀ de dimerización de **2.31** son similares a los del prototipo **2.01**, mientras que la IC₅₀ del péptido **2.35** (Glu2Lys) es de 17.9 ± 0.6 μM, mejorando los valores del prototipo **2.01**.

En conclusión, y a modo de resumen, los ensayos biológicos de los péptidos sintetizados en este trabajo indican que la introducción de restricción conformacional (péptidos grapados, serie 1) en el prototipo lineal **2.01** no mejora los resultados de actividad, a pesar de que los péptidos grapados están mejor estructurados en forma de hélice α en disolución que el prototipo lineal. En cuanto a los análogos lineales (serie 2), los datos experimentales de inhibición de la actividad oxidoreductasa de la Li-TryR obtenidos, permiten señalar al péptido lineal **2.35** (en el que se reemplaza el Glu2 por Lys) como el más activo de los péptidos sintetizados hasta el momento con un valor de IC₅₀ de 1.8 ± 0.3 μM. Asimismo, se ha observado que **2.35** no sólo inhibe la actividad de la TryR sino también su dimerización, mostrando un porcentaje de inhibición superior al prototipo **2.01**. Estos resultados apoyan aproximación de la inhibición de la dimerización de la Li-TryR como un nuevo mecanismo de inhibición de la enzima.

2.7. Estudios de modelización molecular

Como se comentó en la introducción, y según nuestra hipótesis de trabajo, los péptidos diseñados en este Capítulo (miméticos de la hélice α definida por los residuos Pro435-Met447 en la interfaz de dimerización) interaccionarían con uno de los monómeros de la Li-TryR a través del dominio de dimerización, perturbando el proceso de dimerización de la enzima, e inhibiendo así, su actividad catalítica. Con este planteamiento y con el fin de racionalizar los resultados de actividad observados llevamos a cabo simulaciones de dinámica molecular de la interacción de los péptidos con el monómero de la Li-TryR. Para ello, se utilizó el paquete de programas de simulación AMBER 10.0⁵⁸ (*Assisted Model Building with Energy Refinement*). AMBER, además, es el nombre del popular campo de fuerzas⁸⁵. La dinámica molecular (DM) permite abordar el estudio de sistemas complejos en tiempos razonables.

De forma general, para llevar a cabo una simulación de DM en AMBER, se siguen los siguientes pasos:

1. *Definición del sistema a simular y condiciones iniciales* (proteína, ligando, cofactor, etc.). Se puede partir de un modelo teórico, de datos experimentales provenientes de RMN o difracción de rayos X, o de una combinación de ambos. Así, se suele acudir a la base de datos *Protein Data Bank*⁸⁶ (PDB), donde se encuentran depositadas las coordenadas tridimensionales de un gran número de biomoléculas.

2. *Selección del campo de fuerzas y generación de topología del sistema*. Una vez definido el sistema a simular, se selecciona el campo de fuerzas a emplear y se genera el archivo de topología del sistema, donde se recogen parámetros que definen los distintos tipos de átomo, enlaces, ángulos y conectividades entre átomos.

3. *Simulación de dinámica molecular*. Los archivos de coordenadas cartesianas y de topología anteriormente generados son empleados para llevar a cabo la simulación de DM. Generalmente, este paso comienza con una minimización previa a la simulación de DM. Cada paso de la simulación de DM

genera un fotograma o instantánea (*snapshot*) del sistema en un momento dado, que junto con el resto de *fotogramas* permite construir una evolución temporal del sistema con resolución a nivel atómico.

4. *Análisis de trayectorias y resultados.* Por último, se analiza la trayectoria resultante de la simulación de DM. En este punto son múltiples los parámetros que se pueden evaluar, como por ejemplo: energías, desviación cuadrática media (*root-mean-square deviation*, RMSD)...

El primer paso fue el estudio de la estabilidad conformacional del monómero en las condiciones de simulación en disolución acuosa, en ausencia del otro monómero y de inhibidor.

2.7.1. Simulación de DM del monómero de la Li-TryR

Para la construcción de nuestro sistema, se escogió la estructura de la Li-TryR oxidada determinada por difracción de rayos X y depositada en el *Protein Data Bank* por Baicco y colaboradores³⁶ (código PDB: 2JK6). Cada monómero está constituido por 489 residuos y contiene como grupo prostético a una molécula de FAD en su forma oxidada, próxima a los residuos del centro activo Cys52 y Cys57 (Figura 2.38). El dominio de dimerización (destacado en naranja), donde se encuentra el *hot spot* Glu436, está próximo al centro activo (marcado en gris), en el que se localiza una molécula de FAD.

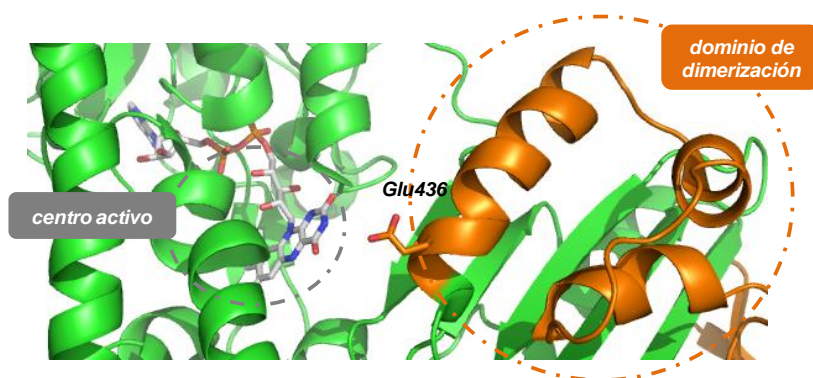


Figura 2.38 | Dominio de dimerización (naranja) en el monómero de la TryR de *L. infantum*. El centro activo (gris) se encuentra a 10 Å.

Para la construcción del sistema, se empleó la herramienta *tLEaP* de AMBER, para el cual se definieron previamente los parámetros geométricos y de cargas de la especie oxidada de FAD. El monómero se situó en una caja de 13376 moléculas de agua TIP3P⁵⁹ con un distancia de 15 Å a los lados de la caja. Además, para neutralizar las cargas se añadieron 11 iones de Na⁺ al sistema (Figura 2.39).

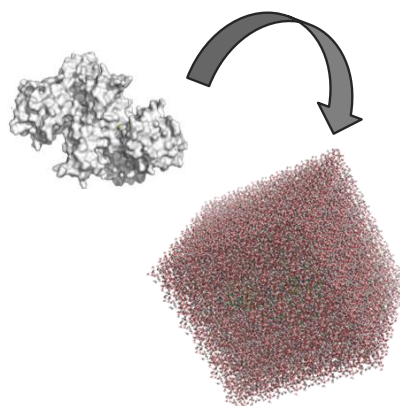


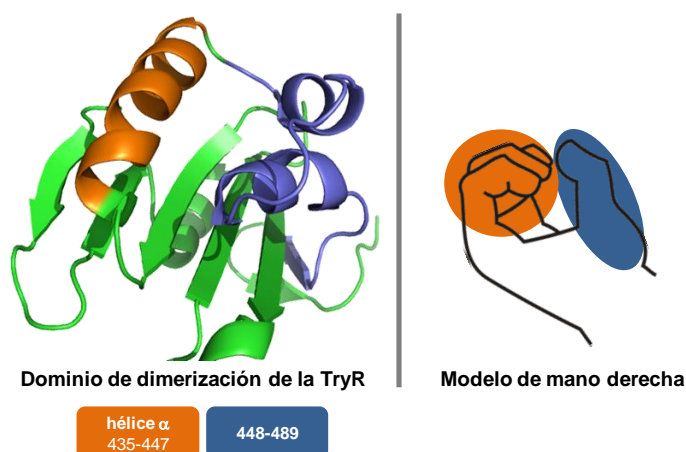
Figura 2.39 | Monómero de la Li-TryR en caja de aguas TIP3P.

Una vez construido el sistema, se llevó a cabo una simulación de DM sin restricciones. En primer lugar, se fijaron todos los átomos del monómero (incluido el cofactor FAD) y se minimizaron los hidrógenos de las moléculas de agua y los iones de Na⁺, en este orden. Posteriormente, y manteniendo los átomos del monómero fijos, se llevó a cabo un calentamiento de 25 ps de todo el sistema. Por último, y antes de llevar a cabo la simulación de DM sin restricciones, se equilibró todo el sistema en cinco ciclos de 2 ps cada uno. Finalmente se llevó a cabo una simulación de DM durante 50 ns a 300 K.

El dominio de dimerización está definido por los residuos 361-489³⁶ y en la estructura cristalina presenta una conformación de que se asemeja a una *mano derecha semi cerrada*, definido por tres motivos: los *dedos* (formados por la hélice

435-448, en naranja), la *palma de la mano* por una lámina β antiparalela (residuos 361-434, en verde), y el *pulgar* por un asa con cierta helicidad en su extremo N-terminal (residuos 448-489, azul) (Figura 2.40a).

(a)



(b)

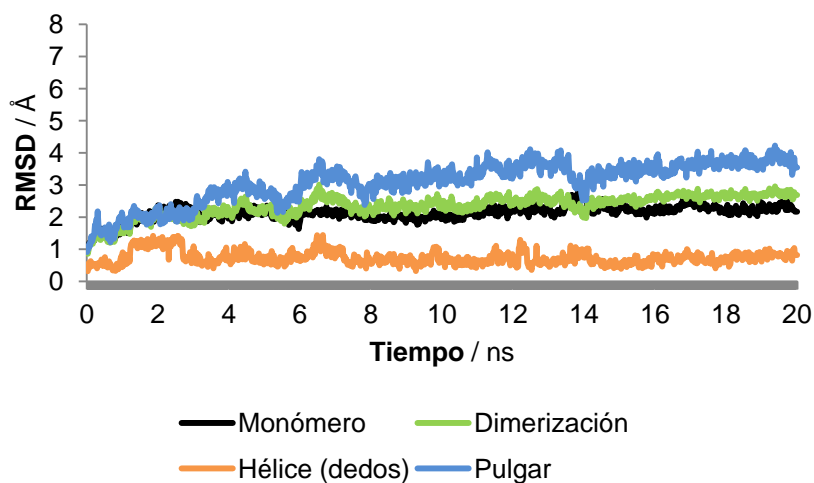


Figura 2.40 | (a) Dominio de dimerización de la Li-TryR y modelo de mano derecha propuesto; (b) evolución de RMSD del esqueleto peptídico del todo el monómero (negro), del dominio de dimerización (verde), y de los subdominios de hélice (naranja) y pulgar (azul).

En la Figura 2.40b se muestra la evolución a lo largo de la simulación de los valores de RMSD del esqueleto peptídico del monómero y de todo el dominio de dimerización así como de sus diferentes motivos. Como se puede observar, el cambio conformacional es debido casi en exclusiva a los residuos que definen el pulgar, ya que los valores de RMSD de la hélice (indicados en naranja) no varían de forma significativa. En cambio, el dominio pulgar (indicado en azul) muestra un salto de aproximadamente 3 angstroms, siendo el causante, por tanto, del incremento en los valores de RMSD observados. Así, los residuos del pulgar, se desplazan aproximadamente 10 Å desde su posición inicial, “lentamente” (en ~18 ns) hacia la hélice del dominio de dimerización. Así, una vez que se pliega sobre los dedos, este dominio permanece en una conformación cerrada sin variaciones significativas en el valor de RMSD durante la mayor parte de la simulación. Además, el dominio pulgar se sitúa en la posición que ocupa la hélice 435'-447' homóloga del otro monómero en la estructura cristalina de la enzima. Este fenómeno de *autoprotección* al disolvente daría cuenta de la importancia estructural de este dominio para la estabilidad de la Li-TryR, ya que en ausencia del otro monómero, protegería a los residuos hidrofóbicos de la hélice de un potencial colapso en disolución.

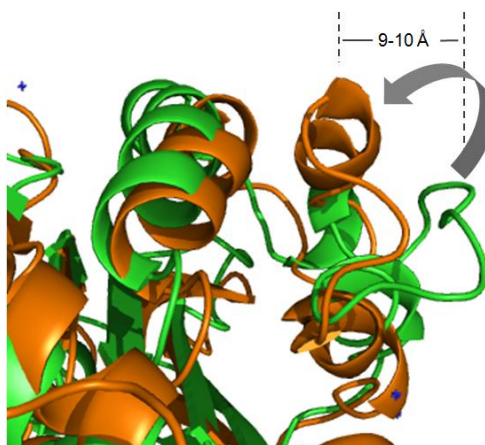


Figura 2.41 | Cambio conformacional observado en la simulación de DM del dominio de dimerización al cabo de 18 ns (naranja). En verde se indica la estructura en el cristal (estructura inicial).

En conclusión, el monómero de la Li-TryR presenta estabilidad conformacional global en las condiciones de simulación de DM. Además, en ausencia del otro monómero, se observa un cambio conformacional significativo en el dominio de dimerización de la enzima, mediante el cual se protege a la hélice α Pro435-Met447 (diana terapéutica de nuestros inhibidores) de la exposición al disolvente.

2.7.2. Simulación de DM de los péptidos sobre el monómero

Seguidamente, estudiamos las interacciones péptido-monómero de la Li-TryR mediante DM. En concreto, se escogieron los péptidos conformacionalmente restringidos **2.06** ($i,i+7$) y **2.07** ($i,i+4$) de la serie 1, y los péptidos lineales **2.34** y **2.35** de la serie 2 (Figura 2.42). En el caso de los péptidos **2.06** y **2.07** se simularon los isómeros Z del doble enlace. Como sistema de referencia se simuló también el prototipo **2.01**.

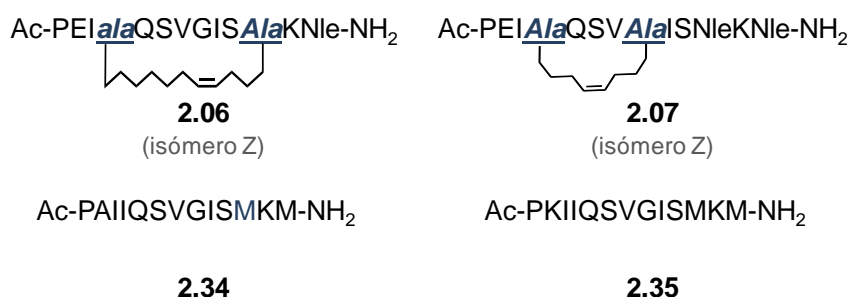


Figura 2.42 | Péptidos simulados con el monómero de la TryR en disolución acuosa.

La construcción de los complejos monómero-péptido fue semejante a la empleada para el monómero. En estos sistemas, el péptido procede de la segunda subunidad y las mutaciones necesarias se realizaron con *tLEaP*. Además, se definieron los parámetros geométricos y de cargas para los aminoácidos no proteinogénicos (los que participan en los cierres covalentes y las Nle) presentes en los péptidos. Los péptidos se situaron en el dominio de dimerización de la enzima, frente a la hélice α 435-447 en el lugar ocupado por la otra hélice homóloga del segundo monómero del dímero de la Li-TryR en el cristal, y el

sistema se situó en una caja de aguas TIP3P. A continuación se llevó a cabo una pequeña minimización energética de los hidrógenos de las moléculas de aguas utilizando el módulo *sander*, y por último, se llevaron a cabo las correspondientes simulaciones de DM sin aplicar ninguna restricción, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Para cada uno de los sistemas péptido-proteína, se llevó a cabo una simulación de DM de 20 ns.

En todos los casos los péptidos no experimentan variaciones significativas en los valores de RMSD a lo largo de las distintas simulaciones de DM, manteniendo valores inferiores a 2 Å (Figura 2.43).

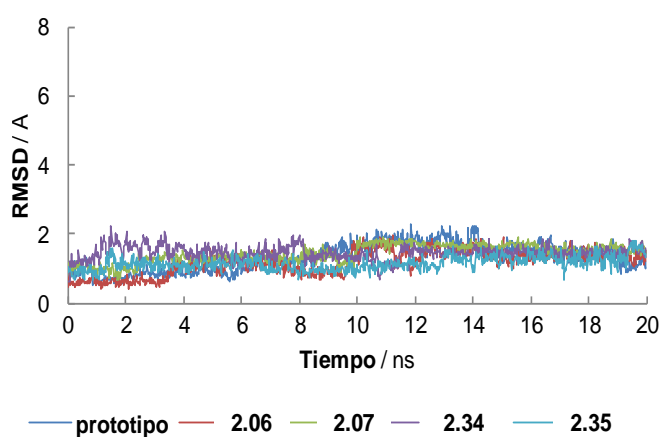


Figura 2.43 | Variación de RMSD de los péptidos en presencia del monómero de la Li-TryR.

Además, los péptidos mantienen su grado de helicidad α lo largo de la simulación, excepto en los extremos de la hélice donde se observa una ligera desorganización de la estructura secundaria (Figura 2.44).

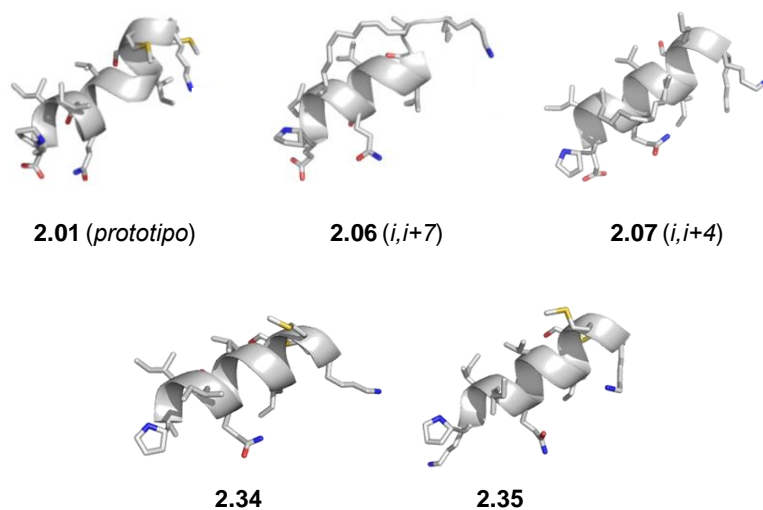


Figura 2.44 | Estructuras representativas de **2.01** (prototipo), **2.06** (i,i+7), **2.07** (i,i+4), **2.34** y **2.35** derivados de las simulaciones de DM (20 ns).

2.7.2.1. Análisis de las interacciones del prototipo **2.01** con la proteína

Tal y como se comentó en los Antecedentes, en la estructura cristalina de la enzima, la hélice 435-448 interacciona a través de las cadenas laterales de los residuos de Glu436 (definido como *hot spot*), Gln439 y Ser440 con la otra subunidad (Figura 2.45) de la Li-TryR.

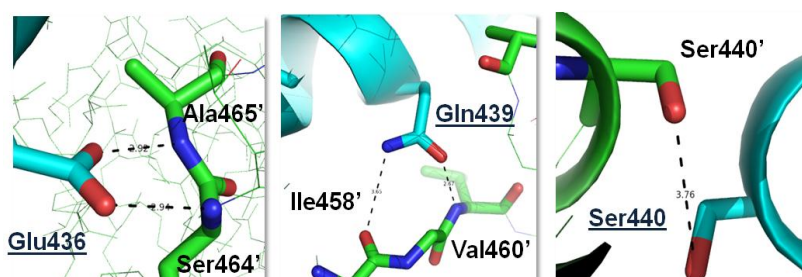


Figura 2.45 | Interacciones de los residuos de la hélice 435-447 (subrayados) con el otro monómero de la TryR de *L. infantum*.

A continuación, se analizaron cada una de estas interacciones en la simulación del péptido prototipo **2.01** sobre el monómero de la Li-TryR. En la Figuras 2.46a y 2.46b se señala la evolución de los enlaces de hidrógeno que la cadena lateral del Glu2 de **2.01** (OE1 y OE2) establece con los protones amídicos de la Ala465 y Ser464, respectivamente. En los dos casos las distancias son inferiores o iguales a 3 Å. Estas dos interacciones se mantienen durante la simulación de DM, como se refleja en las Figuras 2.46a,b. Además, se observa que el Glu2 establece una interacción adicional con la Ser433 a través de su cadena lateral (Figura 2.46c).

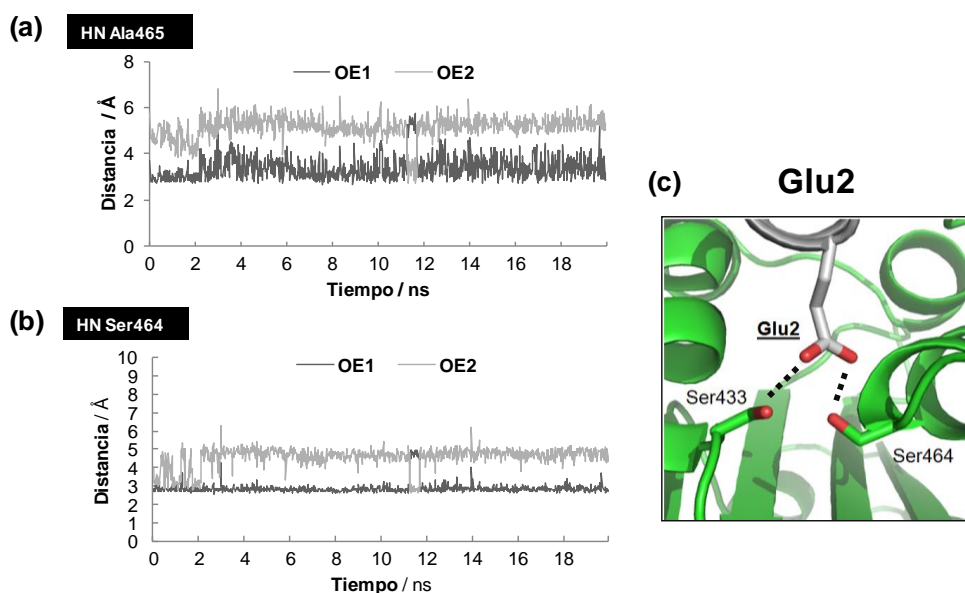


Figura 2.46 | Interacciones que establece el Glu2 durante la simulación de DM de **2.01** (gris) con el monómero de la TryR (verde).

Este elevado número de interacciones del Glu2 del péptido con el monómero se traduce en un anclaje efectivo del extremo N-terminal de **2.01** sobre la superficie de dimerización de la enzima.

En cuanto al residuo de Gln5 de **2.01**, a diferencia de lo que ocurre con el Glu2, se observa que las interacciones iniciales por enlace de hidrógeno de la cadena lateral de la Gln5 con la Ile458 y la Val460 no se mantienen a lo largo de la simulación (Figura 2.47a).

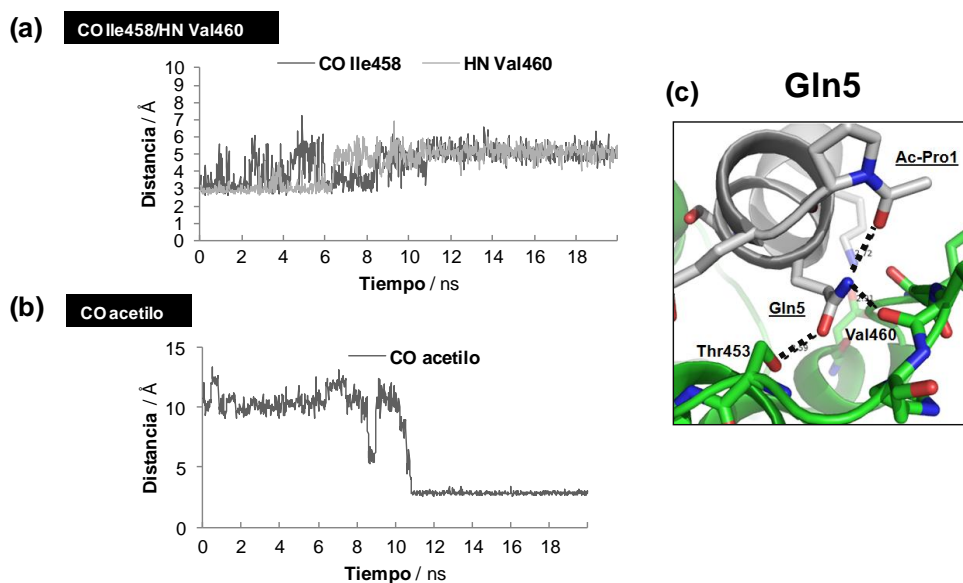


Figura 2.47 | Interacciones que establece la Gln5 durante la simulación de DM de **2.01** (gris) con el monómero de la TryR (verde).

Así, tras cerca de 8 ns de simulación, la cadena lateral de la Gln5 se desplaza, perdiendo las interacciones iniciales con el oxígeno carbonílico de la Ile458 y el protón amídico de la Val460, observándose nuevas interacciones con el monómero a través del oxígeno de la Val460 (en lugar del nitrógeno) y el hidroxilo de la Thr453 (Figura 2.47c). Además, el nitrógeno amídico de la cadena lateral de la Gln5 establece un nuevo enlace intramolecular con el oxígeno carbonílico del acetilo del extremo N-terminal de **2.01**, que una vez formado, permanece el resto de la simulación de DM (Figura 2.47b).

En definitiva, la Gln5 de **2.01** establece un patrón de enlaces de hidrógeno ligeramente distinto al observado en la estructura cristalina de la enzima, que se mantiene a la largo de la simulación.

Finalmente, en lo que se refiere al residuo de Ser6 de **2.01**, se observa que el enlace de hidrógeno con el residuo de Ser440 se pierde rápidamente al comienzo de la simulación (Figura 2.48), observándose en su lugar una interacción intramolecular entre el hidroxilo de la serina y el oxígeno amídico del Glu2 de la hélice.

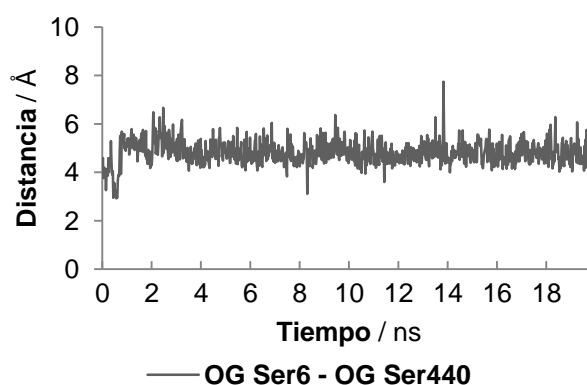


Figura 2.48 | Interacciones de la cadena lateral de Ser6 de **2.01** con la Ser440 del monómero.

Por último, y aunque no se observa en la estructura cristalina de la enzima, se puede destacar cómo la Lys12 a través de su cadena lateral interacciona con el carboxilato del Asp453 (Figura 2.49). Este tipo de interacción, que está ausente al comienzo, permanece la mayor parte de la simulación de DM.

En conclusión, en la simulación de DM del prototipo **2.01** con el monómero de la TryR se mantienen las interacciones clave de los residuos Glu2 y Gln5 observadas en la estructura cristalina de la enzima, aunque con ciertas variaciones. Además, se observa cómo la Lys12 del extremo C-terminal de **2.01** establece una interacción a través de su cadena lateral con el Asp453 del monómero, no presente en la estructura cristalina de la enzima. Sin embargo, la

contribución del residuo de Ser6 del péptido prototipo **2.01** en la interacción con el monómero parece poco importante.

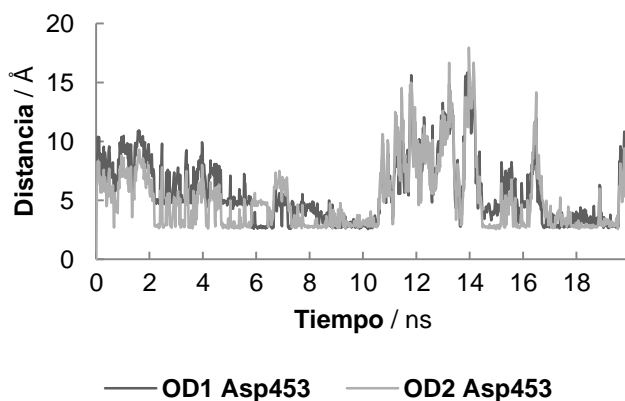


Figura 2.49 | Evolución de la distancia entre el grupo amino de las Lys12 de **2.01** en los péptidos simulados y el carboxilato del Asp453 en la simulación de DM:

2.7.2.2. Análisis de las interacciones de **2.06**, **2.07**, **2.34** (Glu2Ala) y **2.35** (Glu2Lys) con la proteína

Seguidamente, procedimos al análisis de las interacciones de los péptidos grapados (**2.06** y **2.07**) con el monómero de la proteína. En este caso, el patrón de enlaces de hidrógeno que establecía el Glu2 en la simulación de DM de **2.01** con el monómero, no se mantiene a lo largo de la simulación (Figura 2.50). Así, por ejemplo, en la simulación de **2.07** se pierde incluso cualquier interacción del Glu2 con la enzima durante una ventana de 2 ns, desplazándose la hélice hacia el disolvente.

Glu2

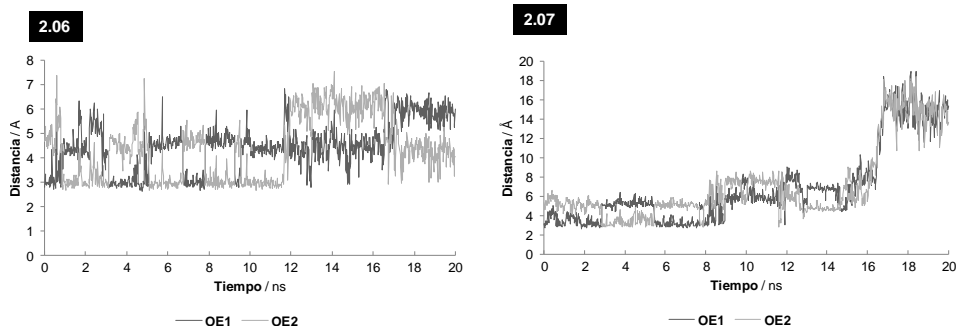


Figura 2.50 | Evolución de las distancias (Å) entre la cadena lateral del Glu2 del péptido y el HN de la Ala465 del monómero en las simulaciones de DM de **2.06** y **2.07** con el monómero de la Li-TryR.

El patrón de interacciones de la Gln5 con la Ile458 y la Val460 en las simulaciones de los péptidos grapados con la Li-TryR se comportan de distinta manera (Figura 2.51). Mientras que en el péptido grapado **2.06** se pierde dicho patrón de interacción y se establece una nueva interacción del oxígeno de la cadena lateral de la Gln5 con el hidroxilo de la Thr463, la Gln5 del péptido **2.07** mantiene las dos interacciones observadas en la estructura cristalina con el protón amídico de la Ile458 y el oxígeno carbonílico de la Val460.

Gln5

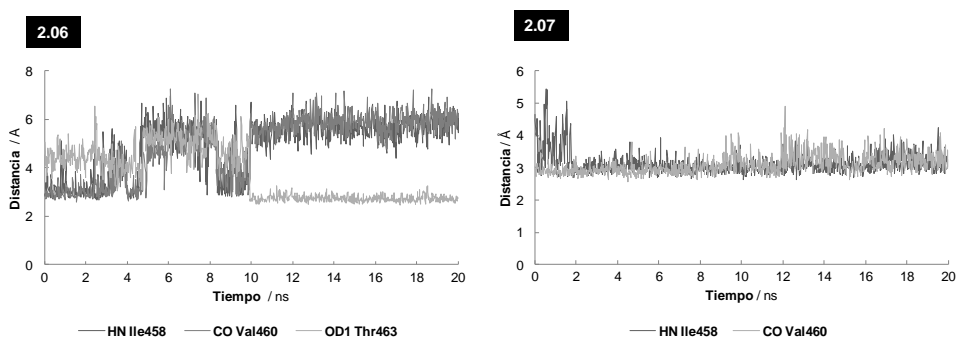


Figura 2.51 | Evolución de las distancias (Å) entre la cadena lateral del Gln5 de **2.06** y **2.07** y varios residuos del monómero de la Li-TryR en las simulaciones de DM.

Finalmente, procedimos al análisis de los resultados de la simulación de DM de los péptidos lineales de la serie 2 con la proteína. En el caso **2.34** (Glu2Ala), el extremo N-terminal del inhibidor se aleja de la proteína hasta 4 Å (si se compara con el prototipo), debido a la ausencia de cualquier interacción que mantenga a esta región del inhibidor sobre la proteína (Figura 2.52). En ausencia de este residuo, son las interacciones a través de las cadenas laterales de Gln5 y Lys12 las que *anclan* el péptido sobre la superficie de la proteína y podrían explicar la actividad observada para este péptido.

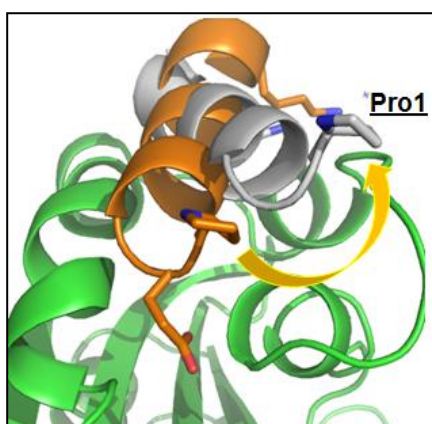


Figura 2.52 | Desplazamiento del extremo N-terminal del péptido **2.34** (gris) tras la simulación. Se superpone la estructura con el prototipo **2.01** (naranja).

En el caso de **2.35** (Glu2Lys), se observa un nuevo patrón de interacciones ausentes en las simulaciones previas. En concreto, la cadena lateral de la Lys2 *encuentra* a los grupos carboxilatos de los residuos de Glu436 y Asp432 del monómero a lo largo de la simulación, estableciéndose una fuerte interacción electrostática de enlace de hidrógeno con estos residuos, muy estable (Figura 2.53), ya que se mantiene a lo largo de toda la simulación. Además, el oxígeno carbonílico de la Pro1 de **2.35** se ancla al monómero a través de dos interacciones de enlace de hidrógeno con la Ser464 (Figura 2.54), lo que se traduce en un anclaje efectivo del extremo N-terminal en el dominio de dimerización.

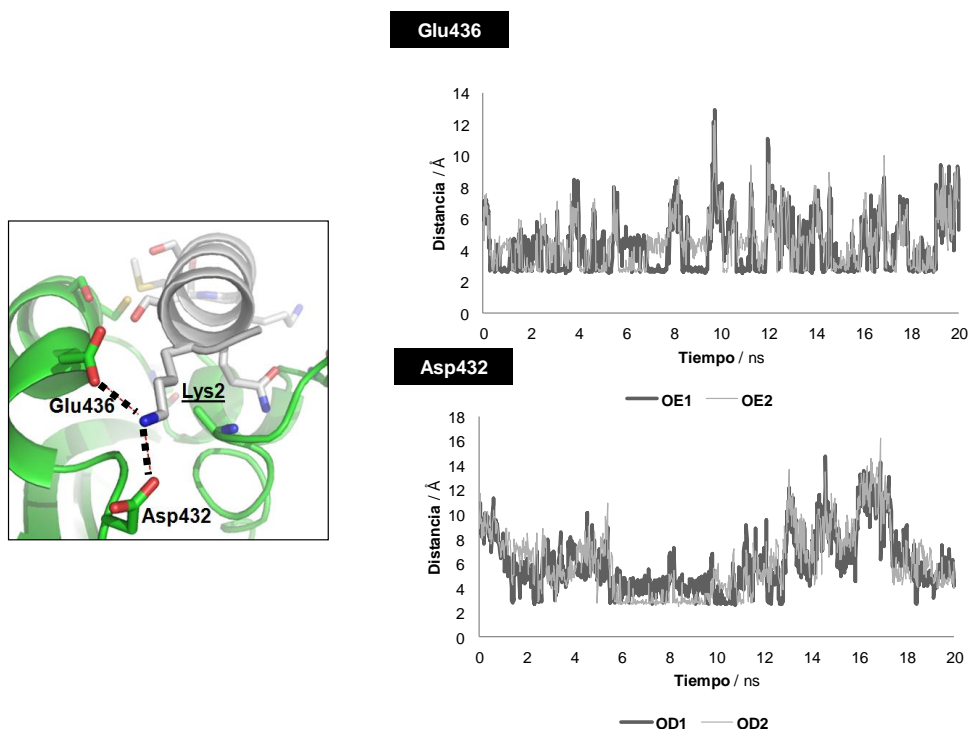


Figura 2.53 | Interacciones entre el residuo de Lys2 de **2.35** (gris) y los residuos de Asp432 y Glu436 de la proteína (verde) y su evolución a lo largo de la simulación.

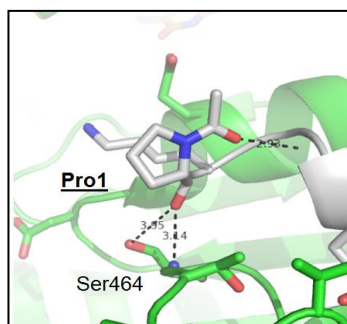


Figura 2.54 | Interacciones entre el residuo de Pro1 en **2.35** (gris) y la Ser464 (verde).

A la vista de estos resultados, cabe destacar que la introducción del residuo de Lys en la posición 2 del péptido supone un anclaje estable con los residuos de Glu436' y Asp432' del monómero. Y debido a que el Glu436 es un

residuo clave para la estabilidad del dímero de la TryR, ello podría explicar la actividad inhibitoria destacada del péptido **2.35**.

2.7.3. Cálculo de la energía libre de unión péptido–monómero de la Li-TryR

Seguidamente, se llevó a cabo un cálculo *in silico* de las energías libres de interacción (ΔG_{bind}) entre los péptidos estudiados y el monómero de la TryR en disolución acuosa en base a las simulaciones de DM usando el método MM-GBSA implementado en AMBER.

El método de MM-GBSA (*Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area*)⁸⁷ se emplea especialmente en el cálculo de energías libres en sistemas complejos en los que están implicados biomoléculas (por ejemplo, ADN-proteína, proteína-ligando ó ADN-ligando) cuyo coste computacional es elevado para llevar a cabo un cálculo *ab initio*. En concreto, MM-GBSA se basa en campos de fuerzas (mecánica molecular) y aplica el modelo generalizado de Born y el método de accesibilidad del disolvente en la determinación de ΔG_{bind} a partir de archivos que contienen información estructural, radios de van der Waals y cargas puntuales de biomoléculas, como por ejemplo son los distintos fotogramas generados en una simulación de MD. De hecho, este programa viene implementado en el paquete de AMBER.

En la Tabla 2.7 se recogen los valores de energías libres de interacción (ΔG_{bind}) calculados con MM-PBSA para los péptidos simulados (**2.06**, **2.07**, **2.34** y **2.35**) con el monómero de la Li-TryR. Además se indican las componentes en fase gas de van der Waals y electrónica $\Delta G_{\text{gas},vdW}$ y $\Delta G_{\text{gas},elec}$, respectivamente, así como las componentes debidas a la desolvatación $\Delta G_{\text{solv},elec}$ (electrónica) y $\Delta G_{\text{solv},np}$ (no polar). Los valores de variación de entropía no se han calculado.

Todos los péptidos establecen una interacción favorable con el monómero de la Li-TryR. Sin embargo, se observan diferencias significativas entre los distintos inhibidores. En concreto, según los valores de ΔG_{bind} , el análogo lineal más activo **2.35** presentaría la interacción más favorable con el monómero de la

enzima, de todos los inhibidores diseñados, con un incremento superior a 20 Kcal·mol⁻¹ en el valor absoluto de ΔG_{bind} respecto al prototipo.

Tabla 2.7 | Energías libres de interacción entre los inhibidores **2.01**, **2.06**, **2.07** y **2.34** y del prototipo **2.35** con el monómero de la Li-TryR (Kcal·mol⁻¹)*.

	2.01 (prototipo)	2.06 (i,i+7)	2.07 (i,i+4)	2.34	2.35
ΔG_{bind}	-38.2 ± 3.9	-51.0 ± 6.0	-46.4 ± 4.4	-40.9 ± 4.0	-59.4 ± 5.0
$\Delta G_{\text{gas,vdW}}$	-57.1±4.2	-63.3±5.6	-74.2±3.9	-58.1±4.5	-73.7±4.7
$\Delta G_{\text{gas,elec}}$	-60.2±15.0	-132.1±23.6	-45.1±20.1	-211.9±25.6	-424.3±23.0
$\Delta G_{\text{solv,elec}}$	88.1±14.14	154.4±21.5	83.1±18.2	237.3±22.0	449.5±22.1
$\Delta G_{\text{solv,np}}$	-9.0±0.4	-10.1±0.7	-10.2±0.4	-8.2±0.5	-10.9±0.4

*Valores resultantes del cálculo MM-GBSA de 400 fotogramas de las simulaciones de DM entre los tiempos de 10 a 18 ns.

Los péptidos grapados **2.06** y **2.07** presentan valores de ΔG_{bind} intermedios, más favorables que el prototipo **2.01** pero menores a las que presenta **2.35**. Cabe resaltar que mientras que para los análogos lineales se observa una buena correlación con sus actividades inhibitorias experimentales, para los péptidos grapados no hay una correlación clara. Este hecho podría explicarse debido a múltiples factores (componentes entrópicas no consideradas, agregación de los péptidos, etc.).

2.7.3.1. Descomposición de la ΔG_{bind} por residuos para el péptido **2.35**

Para el péptido **2.35** se decidió llevar a cabo un estudio teórico de la contribución de cada residuo de la interfaz en el complejo **2.35**–monómero de la simulación de DM a la ΔG_{bind} total, usando MM-GBSA de AMBER.

En la Figura 2.55a se recogen los valores de ΔG_{bind} por residuo del péptido **2.35** así como los correspondientes a varios residuos destacados de la interfaz de dimerización del monómero de la Li-TryR (Figura 2.55b).

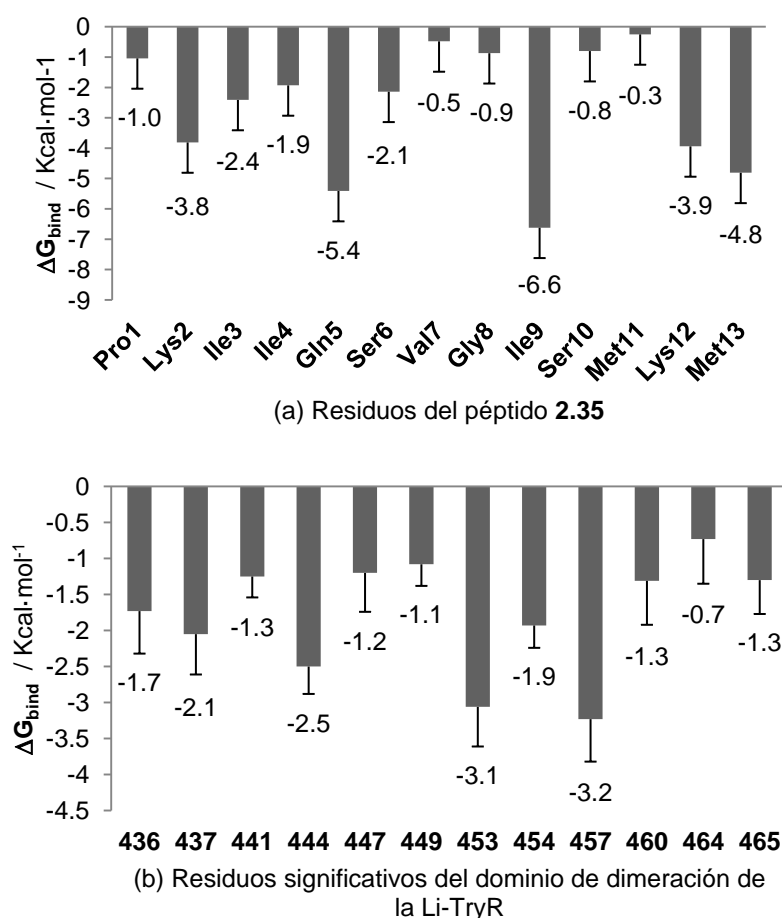


Figura 2.55 | Contribución de cada residuo de **2.35** (a) así como de la interfaz de dimerización (b) a la ΔG_{bind} calculado con el método de descomposición de MM-GBSA.

En cuanto al péptido **2.35**, destacan los residuos que ya habían sido puestos de relieve en el análisis previo, como son Lys2, Gln5 y Lys12. Además, los residuos de Ile9 y Met13 contribuyen favorablemente en la interacción con el monómero. La Ile9 presenta la contribución más favorable a la ΔG_{bind} ($-6.6 \pm 0.6 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$). Si se analizan en detalle cada una de las contribuciones energéticas de este residuo, se observa que la componente hidrófoba (ΔG_{vdW}) es determinante (Figura 2.56a). Este hecho se puede explicar en base a que la cadena lateral de la Ile9 se encuentra *enterrada* en un bolsillo hidrófobo de la superficie de

dimerización de la TryR a lo largo de toda la simulación (Figura 2.56b). El suelo de este bolsillo está formado por la cadena lateral de la Phe454 (marcada en naranja).

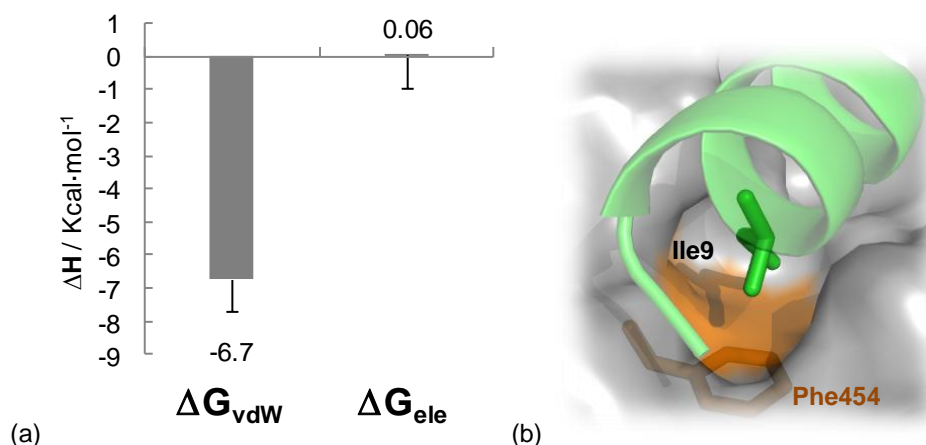


Figura 2.56 | (a) Contribuciones energéticas hidrófoba ($\Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{solv,np}}$) y electrónica (ΔG_{ELE}) del residuo Ile9 (verde) en la interacción de **2.35** con la TryR. (b) Detalle de la Ile9 en el bolsillo hidrófobo (naranja) de la interfaz de dimerización (gris).

La Met13 presenta también una gran contribución hidrófoba debido a su cadena lateral. Al encontrarse en el extremo C-terminal del péptido, e inicialmente expuesto al disolvente, en la simulación de DM se observa cómo la cadena lateral de la Met13 se repliega hacia el interior, cerca de la cavidad donde se encuentra la cadena lateral de Ile9, encontrando acomodo en un entorno hidrófobo.

En cuanto a los residuos de la superficie del monómero de la TryR, destacan en su interacción con **2.35** las contribuciones de los residuos Glu436, Ile437, Cys444, Asp453, Phe454 y Thr457. Estas contribuciones se pueden dividir en dos grupos, según el tipo de interacciones que establecen con **2.35**. En el primero, se encontrarían los residuos con una componente de *van der Waals* alta, y que tal como se observa en la simulación, forman parte de los dos bolsillos hidrófobos donde se *entierran* Gln5 e Ile9. En el primero de ellos se encuentra la Ile437 donde interacciona la Gln5 de **2.35**. El segundo bolsillo está constituido por los residuos de Cys444 y Phe454 enfrentados a la Ile9 de **2.35**. Dentro del

segundo grupo de aminoácidos, se encuentran aquellos que establecen interacciones electrostáticas con **2.35**. Así, el Glu436, definido como *hot spot* para la dimerización de la enzima, interacciona a través de su cadena lateral con el Lys2, residuo que permite a **2.35** *anclarse* al monómero de la enzima de manera efectiva. Por otro lado, Asp453 y Thr457 son los residuos a través de los cuales la cadena lateral de la Lys12 interaccionaría con el monómero.

2.7.4 Modelo de interacción de 2.35 con la enzima

En base a los buenos resultados de inhibición de **2.35** tanto de la actividad enzimática como del proceso de dimerización de la Li-TryR, y recogiendo las observaciones anteriormente mencionadas, se propone finalmente un modelo de interacción del péptido lineal **2.35** con el monómero de la Li-TryR (Figura 2.57).

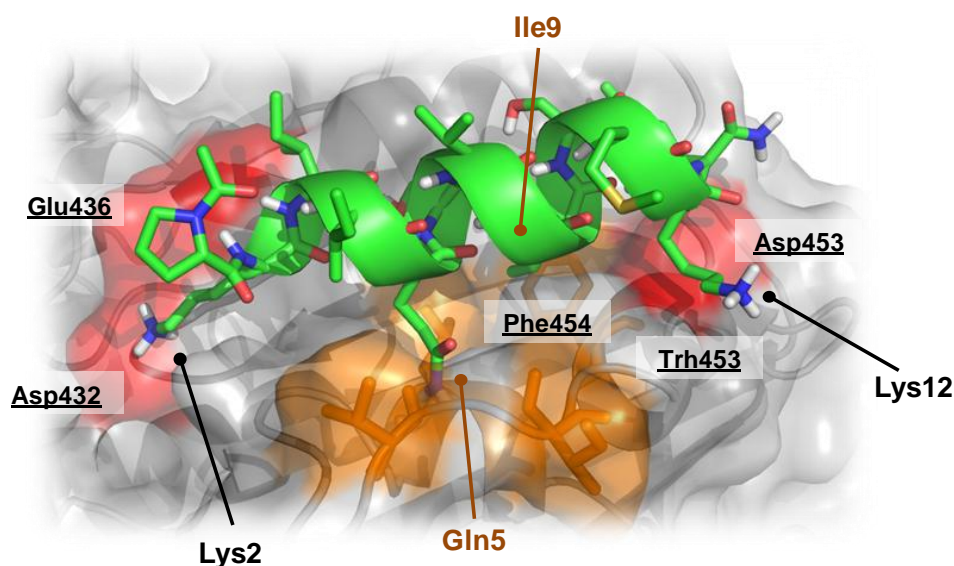


Figura 2.57 | Modelo de interacción de **2.35** (verde) con la TryR de *L. infantum* (gris).

Según el modelo propuesto, el péptido **2.35** interaccionaría con el monómero de la Li-TryR en la interfaz de dimerización, a través de interacciones de naturaleza electrostática e hidrófoba. Por un lado, los residuos de Gln5 e Ile9 se enterrarían en dos nichos hidrófobos (resaltados en naranja), separados entre

sí por una distancia aproximada de 7 Å. En cuanto a las componentes electrostáticas, la cadena lateral del residuo de Lys2 interaccionaría de manera muy efectiva con el carboxilato del residuo clave Glu436 (*hot spot*), y con el Asp432 mediante enlaces de hidrógeno. Asimismo, la interacción de la cadena lateral del residuo de Lys12 con Asp453 y Thr457, ayudaría a fijar el extremo C-terminal del péptido a la superficie del monómero de la Li-TryR.

Según este mecanismo de *anclaje*, el péptido **2.35** perturbaría de manera muy efectiva al residuo Glu436 y su entorno, lo que podría explicar los mejores resultados de inhibición de la actividad enzimática así como de la dimerización de la Li-TryR observados respecto al prototipo inicial **2.01**. Todo ello posiciona a **2.35** como un nuevo *hit* y un excelente punto de partida para el diseño futuro de nuevos inhibidores del proceso de la dimerización de la Li-TryR.

2.8. Bibliografía

1. (a) Herwaldt, B. L., Leishmaniasis. *Lancet* **1999**, 354, 1191-1199; (b) WHO Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
2. Kamhawi, S., Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* **2006**, 22, 439-445.
3. Rosypal, A. C.; Troy, G. C.; Zajac, A. M.; Duncan, R. B., Jr.; Waki, K.; Chang, K. P.; Lindsay, D. S., Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the United States: isolation and immunohistochemical detection of Leishmania infantum from foxhounds from Virginia. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2003**, 50 Suppl, 691-693.
4. Desjeux, P., Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, 27, 305-318.
5. URL: <http://www.dpd.cdc.gov>. DPDx: Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern.
6. Sacks, D. L.; Perkins, P. V., Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. *Science* **1984**, 223, 1417-1419.
7. Bates, P. A.; Robertson, C. D.; Tetley, L.; Coombs, G. H., Axenic cultivation and characterization of Leishmania mexicana amastigote-like forms *Parasitology* **1992**, 105, 193-202.
8. Bates, P. A.; Rogers, M. E., New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania. *Curr. Mol. Med.* **2004**, 4, 601-609.
9. Singh, N.; Kumar, M.; Singh, R. K., Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific J. Trop. Med.* **2012**, 5, 485-497.
10. Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H., Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, 19, 111-126.
11. (a) Croft, S. L.; Brazil, R. P., Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of Leishmania mexicana amazonensis in vitro. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*

1982, 76, 37-43; (b) Croft, S. L.; Brazil, R. P., Some effects of pentamidine isethionate on *Leishmania* species in vitro. *Parasitology* **1979**, 79, R45-R45.

12. Davidson, R. N.; diMartino, L.; Gradoni, L.; Giacchino, R.; Gaeta, G. B.; Pempinello, R.; Scotti, S.; Cascio, A.; Castagnola, E.; Maisto, A.; Gramiccia, M.; diCaprio, D.; Wilkinson, R. J.; Bryceson, A. D. M., Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clin. Infect. Dis.* **1996**, 22, 938-943.

13. Vyas, S. P.; Gupta, S., Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, 1, 417-432.

14. (a) Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Engel, J.; Sindermann, H.; Fischer, C.; Junge, K.; Bryceson, A.; Berman, J., Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **2002**, 347, 1739-1746; (b) Jha, T. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Bachmann, P.; Karbwang, J.; Fischer, C.; Voss, A.; Berman, J., Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **1999**, 341, 1795-1800.

15. Klempner, M. S.; Unnasch, T. R.; Hu, L. T., Focus on research: Taking a bite out of vector-transmitted infectious diseases. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356, 2567-2569.

16. Krauth-Siegel, R. L.; Bauer, H.; Schirmer, H., Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 690-715.

17. Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A., Trypanothione - a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* **1985**, 227, 1485-1487.

18. Dormeyer, M.; Reckenfelderbaumer, N.; Ludemann, H.; Krauth-Siegel, R. L., Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10602-10606.

19. Flohe, L.; Hecht, H. J.; Steinert, P., Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27, 966-984.

20. Shames, S. L.; Fairlamb, A. H.; Cerami, A.; Walsh, C. T., Purification and characterization of trypanothione reductase from *Cristidia fasciculata*, a newly discovered

member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3519-3526.

21. Marsh, I. R.; Bradley, M., Substrate specificity of trypanothione reductase. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 690-694.

22. (a) Lantwin, C. B.; Schlichting, I.; Kabsch, W.; Pai, E. F.; Krauthsiegel, R. L., The structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in the oxidized and NADPH reduced-state. *Proteins* **1994**, *18*, 161-173; (b) Kuriyan, J.; Kong, X. P.; Krishna, T. S. R.; Sweet, R. M.; Murgolo, N. J.; Field, H.; Cerami, A.; Henderson, G. B., X-ray structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.4 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 8764-8768.

23. Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A., Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2603-2612.

24. Leichus, B. N.; Bradley, M.; Nadeau, K.; Walsh, C. T.; Blanchard, J. S., Kinetic isotope effect analysis of the reaction catalyzed by *Trypanosoma concolense* trypanothione reductase. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6414-6420.

25. Krauth-Siegel, R. L.; Coombs, G. H., Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. *Parasitol. Today* **1999**, *15*, 404-409.

26. (a) Tovar, J.; Wilkinson, S.; Mottram, J. C.; Fairlamb, A. H., Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. *Mol. Microbiol.* **1998**, *29*, 653-660; (b) Krieger, S.; Schwarz, W.; Ariyanayagam, M. R.; Fairlamb, A. H.; Krauth-Siegel, R. L.; Clayton, C., Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 542-552; (c) Dumas, C.; Ouellette, M.; Tovar, J.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Tamar, S.; Olivier, M.; Papadopoulos, B., Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* **1997**, *16*, 2590-2598.

27. Baiocco, P.; Ilari, A.; Ceci, P.; Orsini, S.; Gramiccia, M.; Di Muccio, T.; Colotti, G., Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase Activity and *Leishmania infantum* Proliferation. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 230-233.

28. Ilari, A.; Baiocco, P.; Messori, L.; Fiorillo, A.; Boffi, A.; Gramiccia, M.; Di Muccio, T.; Colotti, G., A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids* **2012**, *42*, 803-811.

29. (a) Werbovetz, K. A., Target-based drug discovery for malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 835-860; (b) Schmidt, A.; Krauth-Siegel, R. L., Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1239-1259; (c) O'Sullivan, M. C., The battle against trypanosomiasis and leishmaniasis: Metal-based and natural product inhibitors of trypanothione reductase. *Curr. Med. Chem. Anti-Infect. Agents* **2005**, *4*, 355-378; (d) Linares, G. E. G.; Ravaschino, E. L.; Rodriguez, J. B., Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 335-360.

30. Saravanamuthu, A.; Vickers, T. J.; Bond, C. S.; Peterson, M. R.; Hunter, W. N.; Fairlamb, A. H., Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29493-29500.

31. Patterson, S.; Alphey, M. S.; Jones, D. C.; Shanks, E. J.; Street, I. P.; Frearson, J. A.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H.; Fairlamb, A. H., Dihydroquinazolines as a Novel Class of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Reductase Inhibitors: Discovery, Synthesis, and Characterization of their Binding Mode by Protein Crystallography. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6514-6530.

32. La estructura co-cristalizada de la mepacrina se ha obtenido usando la mostaza de la mepacrina.

33. Como ejemplos: (a) J. G. A. Walton, D. C. Jones, P. Kiuru, A. J. Durie, N. J. Westwood, A. H. Fairlamb, Synthesis and evaluation of indatraline-based inhibitors for trypanothione reductase. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 321-328; (b) Maccari, T. Jaeger, F. Moraca, M. Biava, L. Flohé, M. Botta. A fast virtual screening approach to identify structurally diverse inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5255-5258; (c) C. Eberle, B. S. Lauber, D. Fankhauser, M. Kaiser, R. Brun, R. L. Krauth-Siegel, F. Diederich. Improved inhibitors of trypanothione reductase by combination of motifs: synthesis, inhibitory potency, binding mode, and antiprotozoal activities. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 292-301; (d) R. Perez-Pineiro, A. Burgos, D. C. Jones, L. C.

Andrew, H. Rodriguez, M. Suarez, A. H. Fairlamb, D. S. Wishart. Development of a novel virtual screening cascade protocol to identify potential trypanothione reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1670-1680; (e) S. Patterson, D. C. Jones, E. J. Shanks, J. A. Frearson, I. H. Gilbert, P. G. Wyatt, A. H. Fairlamb. Synthesis and evaluation of 1-(1-(Benzo[b]thiophen-2-yl)cyclohexyl)piperidine (BTCP) analogues as inhibitors of trypanothione reductase. *ChemMedChem* **2009**, 4, 1341-1353; (f) C. Eberle, J. A. Burkhard, B. Stump, M. Kaiser, R. Brun, R. L. Krauth-Siegel, F. Diederich. Synthesis, inhibition potency, binding mode, and antiprotozoal activities of fluorescent inhibitors of trypanothione reductase based on mepacrine-conjugated diaryl sulfide scaffolds. *ChemMedChem* **2009**, 4, 2034-2044; (g) J. L. Richardson, I. R. E. Nett, D. C. Jones, M. H. Abdille, I. H. Gilbert, A. H. Fairlamb. Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. *ChemMedChem* **2009**, 4, 1333-1340; (h) D. Spinks, E. J. Shanks, L. A. T. Cleghorn, S. McElroy, D. Jones, D. James, A. H. Fairlamb, J. A. Frearson, P. G. Wyatt, I. H. Gilbert. Investigation of trypanothione reductase as a drug target in *Trypanosoma brucei*. *ChemMedChem* **2009**, 4, 2060-2069.

34. Nordhoff, A.; Bucheler, U. S.; Werner, D.; Schirmer, R. H., Folding of the four domains and dimerization are impaired by the Gly446-->Glu exchange in human glutathione reductase. Implications for the design of antiparasitic drugs. *Biochemistry* **1993**, 32, 4060-4066.

35. Moreno, D. Estrategias celulares y moleculares en el cribado de nuevos agentes anti-Leishmania. Tesis doctoral, **2010**. Universidad de Alcalá.

36. Baiocco, P.; Franceschini, S.; Ilari, A.; Colotti, G., Trypanothione reductase from *Leishmania infantum*: cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray data analysis. *Protein Pept. Lett.* **2009**, 16, 196-200.

37. Henchey, L. K.; Jochim, A. L.; Arora, P. S., Contemporary strategies for the stabilization of peptides in the α -helical conformation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 692-697.

38. Jones, S.; Thornton, J. M., Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 13-20.

39. (a) Agadir: an algorithm to predict the helical content of peptides <http://agadir.crg.es>; (b) Muñoz, V.; Serrano, L., Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 399-409; (c) Muñoz, V.; Serrano, L., Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. III. Temperature and pH dependence. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 297-308; (d) Muñoz, V.; Serrano, L., Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. II. Helix macrodipole effects and rational modification of the helical content of natural peptides. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 275-296; (e) Muñoz, V.; Serrano, L., Development of the multiple sequence approximation within the AGADIR model of alpha-helix formation: comparison with Zimm-Bragg and Lifson-Roig formalisms. *Biopolymers* **1997**, *41*, 495-509.
40. (a) Andrews, M. J. I.; Tabor, A. B., Forming stable helical peptides using natural and artificial amino acids. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11711-11743; (b) Haridas, V., From Peptides to Non-Peptide Alpha-Helix Inducers and Mimetics. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 5112-5128; (c) Liskamp, R. M. J.; Rijkers, D. T. S.; Kruijtzter, J. A. W.; Kemmink, J., Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1626-1653; (d) Yin, H.; Lee, G.-I.; Hamilton, A. D., Alpha-Helix Mimetics in Drug Discovery. In *Drug Discovery Research*, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; pp 281-299; (e) Garner, J.; Harding, M. M., Design and synthesis of small alpha-helical peptides and mimetics. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3577-3585.
41. (a) Marqusee, S.; Baldwin, R. L., Helix stabilization by Glu...Lys⁺ salt bridges in short peptides of de novo design. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 8898-8902; (b) Huyghues-Despointes, B. M. P.; Martin Scholtz, J.; Baldwin, R. L., Helical peptides with three pairs of Asp-Arg and Glu-Arg residues in different orientations and spacings. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 80-85; (c) Scholtz, J. M.; Qian, H.; Robbins, V. H.; Baldwin, R. L., The energetics of ion-pair and hydrogen-bonding interactions in a helical peptide. *Biochemistry* **1993**, *32*, 9668-9676; (d) Phelan, J. C.; Skelton, N. J.; Braisted, A. C.; McDowell, R. S., A General Method for Constraining Short Peptides to an α -Helical Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 455-460; (e) Peczu, M. W.; Hamilton, A. D., Peptide and Protein Recognition by Designed Molecules. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479-2494; (f) Vila, J. A.; Ripoll, D. R.; Scheraga, H. A., Physical reasons for the unusual α -helix stabilization afforded by charged or neutral polar residues in alanine-rich peptides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13075-13079.

42. (a) Olson, C. A.; Shi, Z.; Kallenbach, N. R., Polar Interactions with Aromatic Side Chains in α -Helical Peptides: $\text{CH}\cdots\text{O}$ H-Bonding and Cation- π Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6451-6452; (b) Tsou, L. K.; Tatko, C. D.; Waters, M. L., Simple Cation- π Interaction between a Phenyl Ring and a Protonated Amine Stabilizes an α -Helix in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14917-14921.
43. (a) Lyu, P.; Liff, M.; Marky, L.; Kallenbach, N., Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides. *Science* **1990**, *250*, 669-673; (b) Lyu, P. C.; Sherman, J. C.; Chen, A.; Kallenbach, N. R., Alpha-helix stabilization by natural and unnatural amino acids with alkyl side chains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5317-5320.
44. Albert, J. S.; Hamilton, A. D., Stabilization of Helical Domains in Short Peptides Using Hydrophobic Interactions. *Biochemistry* **1995**, *34*, 984-990.
45. (a) Zhang, F.; Sadovski, O.; Xin, S. J.; Woolley, G. A., Stabilization of Folded Peptide and Protein Structures via Distance Matching with a Long, Rigid Cross-Linker. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14154-14155; (b) Flint, D. G.; Kumita, J. R.; Smart, O. S.; Woolley, G. A., Using an Azobenzene Cross-Linker to Either Increase or Decrease Peptide Helix Content upon Trans-to-Cis Photoisomerization. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 391-397; (c) Chi, L.; Sadovski, O.; Woolley, G. A., A Blue-Green Absorbing Cross-Linker for Rapid Photoswitching of Peptide Helix Content. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 670-676.
46. (a) Beyer, R. L.; Hoang, H. N.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P., Metal Clips Induce Folding of a Short Unstructured Peptide into an α -Helix via Turn Conformations in Water. Kinetic versus Thermodynamic Products. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15096-15105; (b) Ghadiri, M. R.; Choi, C., Secondary structure nucleation in peptides. Transition metal ion stabilized α -helices. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1630-1632; (c) Ghadiri, M. R.; Fernholz, A. K., Peptide architecture. Design of stable α -helical metalloptides via a novel exchange-inert ruthenium(III) complex. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9633-9635; (d) Kelso, M. J.; Beyer, R. L.; Hoang, H. N.; Lakdawala, A. S.; Snyder, J. P.; Oliver, W. V.; Robertson, T. A.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P., α -Turn Mimetics: Short Peptide α -Helices Composed of Cyclic Metallopentapeptide Modules. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4828-4842; (e) Kelso, M. J.; Hoang, H. N.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P., The First Solution Structure of a Single α -Helical Turn. A Pentapeptide α -Helix Stabilized by a Metal Clip. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10488-10489.

47. Kutchukian, P. S.; Yang, J. S.; Verdine, G. L.; Shakhnovich, E. I., All-Atom Model for Stabilization of α -Helical Structure in Peptides by Hydrocarbon Staples. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4622-4627.
48. Cabezas, E.; Satterthwait, A. C., The Hydrogen Bond Mimic Approach: Solid-Phase Synthesis of a Peptide Stabilized as an α -Helix with a Hydrazone Link. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3862-3875.
49. (a) Bracken, C.; Gulyas, J.; Taylor, J. W.; Baum, J., Synthesis and Nuclear Magnetic Resonance Structure Determination of an α -Helical, Bicyclic, Lactam-Bridged Hexapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6431-6432; (b) Yang, B.; Liu, D.; Huang, Z., Synthesis and helical structure of lactam bridged BH3 peptides derived from pro-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1403-1406; (c) Osapay, G.; Taylor, J. W., Multicyclic polypeptide model compounds. 2. Synthesis and conformational properties of a highly α -helical uncospapeptide constrained by three side-chain to side-chain lactam bridges. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6966-6973; (d) Houston, M. E.; Gannon, C. L.; Kay, C. M.; Hodges, R. S., Lactam bridge stabilization of α -helical peptides: Ring size, orientation and positional effects. *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 274-282.
50. Jackson, D. Y.; King, D. S.; Chmielewski, J.; Singh, S.; Schultz, P. G., General approach to the synthesis of short α -helical peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9391-9392.
51. (a) Cantel, S.; Isaad Ale, C.; Scrima, M.; Levy, J. J.; DiMarchi, R. D.; Rovero, P.; Halperin, J. A.; D'Ursi, A. M.; Papini, A. M.; Chorev, M., Synthesis and conformational analysis of a cyclic peptide obtained via i to i+4 intramolecular side-chain to side-chain azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5663-5674; (b) Jacobsen, Ø.; Maekawa, H.; Ge, N.-H.; Görbitz, C. H.; Rongved, P. I.; Ottersen, O. P.; Amiry-Moghaddam, M.; Klaveness, J., Stapling of a 310-Helix with Click Chemistry. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1228-1238; (c) Kawamoto, S. A.; Coleska, A.; Ran, X.; Yi, H.; Yang, C.-Y.; Wang, S., Design of Triazole-Stapled BCL9 α -Helical Peptides to Target the β -Catenin/B-Cell CLL/lymphoma 9 (BCL9) Protein-Protein Interaction. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1137-1146.
52. Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H., Highly efficient synthesis of covalently cross-linked peptide helices by ring-closing metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3281-3284.

53. Previamente, Grubbs y colaboradores habían descrito el empleo de la reacción de RCM para el entrecruzamiento entre residuos de O-alil Ser, separados por una vuelta de hélice (i, i+4). (a) Blackwell, H.E.; Grubbs, R.H. Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3281-3284; (b) Blackwell, H.E.; Sadowsky, R. J. Howard, J. N. Sampson, J. A. Chao, W. E. Steinmetz, D. J. O'Leary, R. H. Grubbs. Ring-Closing Metathesis of Olefinic Peptides: Design, Synthesis, and Structural Characterization of Macrocyclic Helical Peptides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5291–5302.
54. Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L., An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5891-5892.
55. Kim, Y.-W.; Kutchukian, P. S.; Verdine, G. L., Introduction of All-Hydrocarbon i,i+3 Staples into alpha-Helices via Ring-Closing Olefin Metathesis. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3046-3049.
56. Bernal, F.; Tyler, A. F.; Korsmeyer, S. J.; Walensky, L. D.; Verdine, G. L., Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2456-2457.
57. (a) Gavathiotis, E.; Suzuki, M.; Davis, M. L.; Pitter, K.; Bird, G. H.; Katz, S. G.; Tu, H.-C.; Kim, H.; Cheng, E. H. Y.; Tjandra, N.; Walensky, L. D., BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* **2008**, *455*, 1076-1081; (b) Oh, K. J.; Barbuto, S.; Pitter, K.; Morash, J.; Walensky, L. D.; Korsmeyer, S. J., A membrane-targeted BID BCL-2 homology 3 peptide is sufficient for high potency activation of BAX in vitro. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36999-37008; (c) Walensky, L. D.; Pitter, K.; Morash, J.; Oh, K. J.; Barbuto, S.; Fisher, J.; Smith, E.; Verdine, G. L.; Korsmeyer, S. J., A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol. Cell* **2006**, *24*, 199-210; (d) Walensky, L. D., BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 1339-1350; (e) Stewart, M. L.; Fire, E.; Keating, A. E.; Walensky, L. D., The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 595-601; (f) Verdine, G. L.; Hilinski, G. J., Chapter one - Stapled Peptides for Intracellular Drug Targets. In *Methods Enzymol.*, Wittrup, K. D.; Gregory, L. V., Eds. Academic Press: **2012**; 503, 3-33.

58. Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, I., T.E. ; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossvai, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, V.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A., *Amber 11*. **2010**.
59. Aqvist, J., Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8021-8024.
60. Kabsch, W.; Sander, C., Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577-2637.
61. Williams, R. M.; Im, M. N., Asymmetric synthesis of monosubstituted and alpha,alpha-disubstituted alpha-amino acids via diastereoselective glycine enolate alkylations. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9276-9286.
62. Shi, B.; Hawryluk, N. A.; Snider, B. B., Formal Synthesis of (±)-Guanacastepene A. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1030-1042.
63. López-Leonardo, C. Síntesis asimétrica. Algunos modelos para la predicción de configuraciones de estereocentros creados en procesos enantio o diastereoselectivos. <http://www.ch.ic.ac.uk/GIC/este/este1.html>.
64. Cahn, R. S.; Ingold, C.; Prelog, V., Specification of Molecular Chirality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5*, 385-415.
65. (a) Dale, J. A.; Mosher, H. S., Nuclear magnetic resonance enantiomer regents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and .alpha.-methoxy-.alpha.-trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512-519; (b) Kusumi, T.; Fukushima, T.; Ohtani, I.; Kakisawa, H., Elucidation of the absolute configurations of amino acids and amines by the modified mosher's method. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2939-2942.

66. Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R., The Assignment of Absolute Configuration by NMR. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17-118.
67. Mengel, A.; Reiser, O., Around and beyond Cram's Rule. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1191-1224.
68. Chan, W. C.; White, P. D., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A practical Approach. *Oxford University Press* **2000**.
69. Tickler, A. K.; Barrow, C. J.; Wade, J. D., Improved preparation of amyloid- β peptides using DBU as N α -Fmoc deprotection reagent. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 488-494.
70. Robinson, A. J.; Elaridi, J.; Van Lierop, B. J.; Mujcinovic, S.; Jackson, W. R., Microwave-assisted RCM for the synthesis of carbocyclic peptides. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 280-285.
71. (a) Stymiest, J. L.; Mitchell, B. F.; Wong, S.; Vederas, J. C., Synthesis of biologically active dicarba analogues of the peptide hormone oxytocin using ring-closing metathesis. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 47-49; (b) Stymiest, J. L.; Mitchell, B. F.; Wong, S.; Vederas, J. C., Synthesis of Oxytocin Analogues with Replacement of Sulfur by Carbon Gives Potent Antagonists with Increased Stability. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7799-7809.
72. (a) Velluz, L.; Legrand, M.; Grosjean, M., Optical Circular Dichroism: Principles, Measurements, and Applications. 1965; (b) Beychok, S., Circular dichroism of biological macromolecules. *Science* **1966**, *154*, 1288-1299; (c) Vennyaminov, S. Y.; Yang, J. T., Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. 1996.
73. (a) Roccatano, D.; Colombo, G.; Fioroni, M.; Mark, A. E., Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12179-12184; (b) Buck, M., Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys.* **1998**, *31*, 297-355.
74. Luo, P.; Baldwin, R. L., Mechanism of Helix Induction by Trifluoroethanol: A Framework for Extrapolating the Helix-Forming Properties of Peptides from Trifluoroethanol/Water Mixtures Back to Water. *Biochemistry* **1997**, *36*, 8413-8421.

75. Shepherd, N. E.; Hoang, H. N.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P., Single Turn Peptide Alpha Helices with Exceptional Stability in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2974-2983.
76. Wang, D.; Chen, K.; Kulp, J. L.; Arora, P. S., Evaluation of Biologically Relevant Short α -Helices Stabilized by a Main-Chain Hydrogen-Bond Surrogate. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9248-9256.
77. Günter, P. The CYANA Wiki. <http://www.cyana.org>.
78. Shen, Y.; Delaglio, F.; Cornilescu, G.; Bax, A., TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts *J. Biomol. NMR* **2009**, *44*, 213-223.
79. Herramienta disponible dentro de la URL: expasy.org
80. (a) Bacsa, B.; Bösze, S.; Kappe, C. O., Direct Solid-Phase Synthesis of the β -Amyloid (1-42) Peptide Using Controlled Microwave Heating. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2103-2106; (b) Loffredo, C.; Assunção, N. A.; Gerhardt, J.; Miranda, M. T. M., Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis at 60 °C: alternative conditions with low enantiomerization. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 808-817.
81. Beck, W.; Jung, G., Convenient reduction of S-oxides in synthetic peptides, lipopeptides and peptide libraries. *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 31-37.
82. Hamilton, C. J.; Saravanamuthu, A.; Eggleston, I. M.; Fairlamb, A. H., Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem. J.* **2003**, *369*, 529-537.
83. URL: www.genscript.com/peptide_screening_tools
84. Sluis-Cremer, N.; Hamamouch, N.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Balzarini, J.; Camarasa, M.-J., Structure-activity relationships of 2',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) thymine derivatives as inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4834-4841.

85. Case, D. A.; III, T. E. C.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Jr., K. M. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R., The Amber biomolecular simulation programs. *J. Computat. Chem.* **2005**, 26, 1668-1688.
86. Protein Data Bank, URL: www.pdb.org
87. Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E., Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 889-897.

3

Conclusiones generales

En la presente tesis doctoral se ha llevado a cabo el diseño y síntesis de inhibidores de interacciones proteína-proteína de dos enzimas diméricas, la Transcriptasa Inversa del VIH-1 y la Tripanotión Reductasa de *Leishmania infantum*. Con la síntesis de este tipo de inhibidores se pretende explorar un mecanismo de inhibición novedoso, alternativo y poco explorado. Para ello se ha seguido una estrategia común que ha consistido en el diseño de péptidos y peptidomiméticos que mimetizan la estructura secundaria de *hot spots* previamente identificados en nuestro grupo de investigación.

En el **primer capítulo** se aborda la preparación de inhibidores del proceso de dimerización de la TI del VIH-1. En concreto se preparan hexapéptidos cíclicos análogos del prototipo **1.12** mimético de la región de giro β del asa $\beta 7/\beta 8$ de la subunidad p51 (*hot spot*) en los que se ha reemplazado el puente disulfuro por otros tipos de cierres covalentes. Los resultados más significativos de este capítulo se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Se han sintetizado tres series de hexapéptidos cíclicos portadores de puentes hidrocarbonados insaturados y saturados (**1.13-1.17**, serie 1), de un anillo de 1,2,3-triazol-1,4-disustituido (**1.18** y **1.19**, serie 2) y de un enlace amida (**1.20** y **1.21**, serie 3) en el cierre covalente.
- En todos los casos, la síntesis de los precursores lineales así como la ciclación de éstos, se ha realizado mediante síntesis manual en fase sólida. Se han optimizado diferentes rutas sintéticas para la ciclación. En la reacción de metátesis el empleo de microondas permitió reducir drásticamente los tiempos de reacción y aumentar las conversiones. En la reacción de cicloadición catalizada por Cu el uso de una base de mayor pK_a (piperidina en lugar de 2,4-lutidina) y microondas fue decisivo en la optimización de la reacción.
- Se ha realizado un análisis conformacional en disolución mediante RMN de los péptidos sintetizados y se ha hecho un cálculo de estructura usando el programa CYANA comparando las estructuras de los péptidos con el prototipo **1.12** y con el asa $\beta 7/\beta 8$ de la proteína nativa.
- Las mejores estructuras calculadas a partir de las señales NOE/ROE de todos los péptidos presentan unos valores de RMSD en la superposición del esqueleto peptídico menores que 1.0, lo que indica una buena calidad en la superposición y que los péptidos **1.13-1.21** pueblan mayoritariamente en disolución una sola estructura de forma definida.
- La sustitución del puente disulfuro del péptido prototipo **1.12** por otros tipos de cierre covalente en los péptidos **1.13-1.21** se ha traducido en péptidos cíclicos con una conformación bien definida en disolución alrededor de la secuencia IENN del giro similar a la del prototipo.
- Se observan diferencias significativas en los valores de RMSD de la

superposición de los péptidos cíclicos con el asa $\beta 7/\beta 8$ de la proteína. Destaca el péptido **1.17** (portador de un cierre covalente hidrocarbonado saturado de cinco metilenos, serie 1) que es el que presenta en disolución una mayor similitud con el asa, igual o ligeramente superior a la que presenta el prototipo **1.12** (0.2 vs 0.5).

En el segundo capítulo se aplica la estrategia a la búsqueda de inhibidores de la TryR de *Leishmania infantum*. Para ello se diseñan péptidos y peptidomiméticos análogos del péptido prototipo **2.01**, mimético de una hélice α (*hot spot*) en la interfaz de dimerización de la enzima. Con el fin de optimizar dicho prototipo se han preparado dos series de análogos. Una primera serie de péptidos grapados (**2.05-2.08**) portadores de un cierre covalente hidrocarbonado entre los residuos de las posiciones i , $i+7$ (dos pasos de vuelta) o i , $i+4$ (un paso de vuelta) y una segunda serie de péptidos lineales análogos del prototipo (**2.30-2.35**) en los que se han modificado distintos residuos de la secuencia. Los resultados más relevantes son los siguientes:

- El diseño de las mejores posiciones de ciclación en los péptidos grapados se realizó mediante un estudio teórico de predicción del grado de helicidad de los péptidos en caja de agua. Se eligieron las posiciones 4 y 11 para la grapa i , $i+7$ (mayor estructuración en el extremo N-terminal) y las posiciones 4 y 8 para la grapa i , $i+4$ (estructuración más homogénea a lo largo de toda la hélice). En todos los casos se sustituyeron los residuos de Met por Nle con el fin de evitar problemas de oxidación.
- Para la preparación de los péptidos de la serie 1, fue necesario, en primer lugar, la síntesis asimétrica de los aminoácidos cuaternarios (*S*)-**2.02** y (*R*)-**2.05**, residuos sobre los que se genera el cierre covalente. La configuración absoluta de estos aminoácidos se determinó mediante su derivatización a sus amidas de Mosher correspondientes y posterior estudio por RMN obteniéndose excesos enantioméricos superiores al 95%.
- En la síntesis de la serie de análogos lineales (serie 2) cabe destacar que

el empleo de irradiación de microondas (40°C) y de HCTU/DIEA en las etapas de acoplamiento ha permitido reducir considerablemente los tiempos de reacción.

- Se ha realizado un estudio estructural en disolución mediante dicroísmo circular y RMN de los péptidos grapados de la serie 1. La introducción de un cierre covalente entre dos residuos de la secuencia peptídica de **2.06a** (i,i+7) y **2.07** (i,i+4) ha permitido que se estructuren en forma de hélice α en disolución acuosa en ausencia del entorno de la proteína, a diferencia del péptido prototipo lineal **2.01**, que en estas condiciones está desestructurado. En los estudios de RMN se observa una mejor estructuración cuando el cierre covalente se introduce entre residuos situados a dos pasos de vuelta de hélice (**2.06a**) que entre residuos situados a un solo paso de vuelta (**2.07**).
- Los péptidos sintetizados en este capítulo se han evaluado como inhibidores de la actividad oxidorreductasa de la Li-TryR así como inhibidores de la dimerización de esta enzima.
- Los péptidos grapados entre las posiciones 4 y 11 (**2.06a,b** y **2.08**) muestran un menor porcentaje de inhibición de la actividad enzimática que el péptido lineal prototipo **2.01**. Sin embargo, la presencia de un cierre covalente entre los residuos 4 y 8 (**2.07** y **2.09**) da lugar a una actividad similar o superior al prototipo. El aumento de actividad observado es debido a la presencia de los dos residuos de Nle (como se observó posteriormente en los análogos lineales) y no a un efecto beneficioso del cierre covalente en la actividad. A diferencia del péptido lineal prototipo, los péptidos grapados en general no inhiben el proceso de dimerización de la enzima observándose en alguno de los casos un ligero aumento del porcentaje de dimerización.
- En cuanto a los análogos lineales, la sustitución de los dos residuos de Met por Nle (**2.31**) se traduce en un aumento del porcentaje de inhibición de la actividad enzimática respecto al prototipo (53% vs 21%). La sustitución del residuo de Glu2 por un residuo de Lys (**2.35**) ha dado lugar a unos valores de inhibición

del 82% marcadamente superiores al prototipo, siendo **2.35** el compuesto más activo de los sintetizados hasta el momento con un valor medio de IC_{50} de $1.8 \pm 0.3 \mu M$. Asimismo, se ha observado que **2.35** no sólo inhibe la actividad de la TryR sino también su dimerización con valores de IC_{50} superiores al prototipo.

- Con el fin de racionalizar los resultados de actividad observados se han realizado simulaciones de dinámica molecular de la interacción de los péptidos con el monómero de la Li-TryR. De estos estudios cabe destacar que la introducción del residuo de Lys en la posición 2 del péptido supone un anclaje estable con los residuos de Glu436 y Asp432 del monómero. El hecho de que el Glu436 sea un residuo clave para la estabilidad del dímero de la TryR, podría explicar los mejores resultados de inhibición de la actividad enzimática así como de la dimerización de la Li-TryR observados respecto al prototipo inicial **2.01**. Finalmente, se ha propuesto un modelo de interacción de **2.35** en la interfaz de dimerización de la enzima, que podría ser un excelente punto de partida para el diseño futuro de nuevos inhibidores del proceso de la dimerización de la Li-TryR.

4

Parte experimental

4.1. Métodos generales

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al H₂O se realizaron en estrictas condiciones anhidras bajo atmósfera de argón. Los sólidos higroscópicos fueron secados previamente en una pistola de vacío durante 24 h empleando P₂O₅ como agente desecante. El DCM, el CH₃CN y la DMF se secaron refluviéndolos sobre CaH₂ o con tamiz molecular de 3 y 4 Å activado previamente en el microondas. El THF se destiló sobre Na y benzofenona.

Las reacciones en fase sólida se sometieron a agitación orbital en un equipo IKA-100 a una velocidad de agitación de 200 rpm.

Los experimentos de irradiación de microondas se realizaron en un reactor de microondas monomodo *Initiator™ Eight (Biotage AB)*.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga termostatzada Universal 320R de Hettich, utilizando tubos Falcon de polipropileno de 50 mL.

Los análisis elementales se realizaron en un analizador LECO CHNS-932 (Centro de Química Orgánica Manuel Lora Tamayo, CSIC) y se hallan en el rango de un 0.4% de error respecto a los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares.

Los puntos de fusión de los sólidos obtenidos se midieron en un aparato *Mettler Toledo* y no están corregidos.

Para realizar las medidas de rotación óptica se utilizó un polarímetro *Perkin Elmer* 241 MC. Se registraron las medidas a temperatura ambiente irradiando la muestra situada en una microcelda de 1 mL con una lámpara de sodio (línea D del sodio, 589 nm).

Los espectros de masas en modo Electrospray (ESI) se han registrado en un espectrómetro *Hewlett-Packard 1100SD* en modos positivo o negativo, utilizando como portador MeOH o bien mezclas de MeOH-CH₃CN con un 1% de ácido fórmico. Los espectros de masas exactas (HRMS) se han realizado en un equipo Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS equipado con un cromatógrafo de líquidos HP-1200 (Agilent) acoplado a espectrómetro de masas con analizador de masas híbrido Q-TOF 6520. Normalmente un error igual o menor de 5 ppm es suficiente para la determinación de la masa exacta. En estas técnicas los picos [M+H]⁺ y [M+Na]⁺ suelen ser las señales más significativas.

Los espectros de infrarrojo se han registrado en un equipo *Perkin Elmer Spectrum One*. Los productos fueron liofilizados disueltos en una mezcla CH₃CN/H₂O empleando un liofilizador *Telstar 6-80*.

Métodos cromatográficos

El seguimiento de las reacciones en disolución se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F₂₅₄ (Merck), de un espesor de capa de 0.2 mm. Los compuestos se visualizaron con luz ultravioleta a 254 y 365 nm, mediante pulverización con una disolución de H₂SO₄ al 5% en EtOH, de ninhidrina al 2% en EtOH o de ácido fosfomolibdico al 5% en EtOH y calefacción.

Los HPLC analíticos se realizaron en un aparato *Waters* 600 o en un aparato *Agilent*. En todos los casos se empleó una columna de fase reversa *Sunfire C18*

(4,6 mm x 150 mm, 3,5 μ m), un detector de UV de longitud de onda variable (*Waters*) o un diodo *array* (*Agilent*). La fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a mezclas de A: CH₃CN y B: H₂O (0.05% TFA) en modo isocrático o en gradiente. En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min y la detección de picos se realizó por UV a 214, 220 y 254 nm. Los gradientes empleados fueron los siguientes: **gradiente 1**, 5% inicial de A, gradiente lineal de 30 min hasta 100% de A; **gradiente 2**, 10% inicial de A, gradiente lineal de 10 min hasta 100% de A; **gradiente 3**, 2% inicial de A, gradiente lineal de 30 minutos hasta 15% de A; **gradiente 4**, 10% inicial de A, gradiente lineal de 10 min hasta 80% de A.

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC/MS) se realizó en un cromatógrafo *Waters* integrado por un módulo de separación 2695, un detector *Photodiode Array* 2996 y un espectrómetro de masas *Micromass ZQ 2000*, utilizando una columna de fase reversa *Waters XBridge C₁₈* (2,1 mm x 100 mm, 3,5 μ m). Como fase móvil se emplearon mezclas de A: CH₃CN (0,08% ácido fórmico) y B: H₂O (0,1% ácido fórmico). Se utilizaron los siguientes gradientes: **gradiente 1**, 5% inicial de A, gradiente lineal de 15 minutos hasta 80% de A; **gradiente 2**, 10% inicial de A, gradiente lineal de 20 minutos hasta 100% de A.

La purificación de los productos de disolución se ha realizado por: cromatografía en columna utilizando como soporte gel de sílice 60 Merck 230-400 mesh; cromatografía circular centrífuga en capa fina (CCTCL) en un *Cromatotrón® Harrison Research* modelo 8924 (gel de sílice 60 P.F.F₂₅₄ con Ca₂SO₄), en placas de 1 y 2 mm de espesor con velocidad de flujo de 4 u 8 mL/min, respectivamente; y cromatografía de media presión (HPFC) en un sistema *SP1* o *Isolera (Biotage AB)*, empleando cartuchos SNAP de sílice KP-Sil de 10 g (21 x 55 mm) con una velocidad de flujo de 10 mL/min.

Los péptidos descritos en esta memoria se han purificado en fase reversa por tres métodos empleando diferentes gradientes utilizando como fases móvil A (CH₃CN) y como fase móvil B (H₂O + 0.05% TFA):

- Cromatografía de media presión (HPFC) en un sistema *SP1* o *Isolera (Biotage AB)* usando cartuchos KP-C18-HS 12 g (21 x 55 mm) en un gradiente de 0% inicial de A, hasta un 20% de B en 30 minutos, si no se indica lo contrario. La velocidad de flujo ha sido de 6 mL/min y la detección se ha realizado a 214 y 254 nm.
- Cromatografía de extracción de fase sólida a vacío (*manifold*) en cartuchos C18 Discovery SPE (*Aldrich*) utilizando gradientes lineales variables. La fase estacionaria se equilibró previamente con lavados de 100% A, A:B 50:50 y 100% B. La muestra se cargó disuelta en la mínima cantidad de H₂O.
- HPLC semipreparativo en un aparato *Waters* integrado por una bomba *Delta 600*, un detector de absorbancia dual 2487 y un colector de fracciones *Fraction Collector III*, utilizando una columna ACE 5 C18-300 (250 x 10 mm). La velocidad de flujo ha sido de 6 mL/min utilizando un gradiente lineal de 3% inicial de A, hasta un 30% de A en 27 min y con una detección en continuo a longitudes de onda de 214 y 254 nm. Para la inyección del crudo de reacción, los compuestos se disolvieron en la mínima cantidad de H₂O.

En todos los casos, las distintas fracciones de la purificación se analizaron por HPLC analítico y/o HPLC-MS. Los péptidos finales presentaron una pureza superior al 95% en HPLC analítico, salvo que se indique lo contrario.

Métodos para la determinación estructural

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian *INOVA-300* (a 300 y 75 MHz), *Varian INOVA-400* (a 400 y 100 MHz), *Varian MERCURY-400* (a 400 y 100 MHz), *Varian UNITY-500* (a 500 y 125 MHz) en el Centro de Química Orgánica Manuel Lora Tamayo (CSIC), o en un espectrómetro *Bruker Avance 600* equipado con criosonda TXI (a 600.13 y 150.03 MHz) en el Instituto de Química Física Rocasolano (CSIC) utilizando TMS o DSS como referencia interna. Se han indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; m, multiplete; sa, singlete ancho), el valor de la constante de acoplamiento (Hz) y la asignación estructural. Los espectros monodimensionales de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en condiciones estándar. En aquellos compuestos cuyos espectros monodimensionales presentaban complejidad, la asignación de las diferentes señales de los espectros de ^1H -RMN se realizó mediante experimentos de correlación homonuclear (^1H , ^1H COSY, ^1H , ^1H TOCSY) y las de ^{13}C -RMN mediante experimentos de correlación heteronuclear ^1H , ^{13}C de tipo HSQC.

Los espectros de dicroísmo circular se han adquirido en un espectrómetro *Jasco 715* (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC) equipado con una celda *Hellma* de 1 mm de paso óptico.

4.2. Productos comerciales

Acetona- d_6	MERCK
Ácido acético	SCHARLAU
Ácido cítrico	ALDRICH
Ácido <i>p</i> -toluensulfónico	ALDRICH
Ac ₂ O	ALDRICH
Benzofenona	ALDRICH
Hidruro cálcico	FLUKA
CDCl ₃	MERCK
Cloruro de (<i>R</i>)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacetilo	ALDRICH
Cloruro de (<i>S</i>)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacetilo	ALDRICH
[Cl ₂ (PCy ₃)(Imes)Ru=CHPh] (catalizador de Grubbs)	ALDRICH
CuI	ALDRICH
DBU	FLUKA
DIC	FLUKA
DIEA	ALDRICH
DMSO- d_6	MERCK
EDT	ALDRICH
Fmoc-Ala-OH	NOVABIOCHEM
Fmoc-Asn(Trt)-OH	GL BIOCHEM
Fmoc-Asp(OAl)-OH	NEOSYSTEM
Fmoc-Asp(tBu)-OH	NEOMPS
Fmoc-Dap-OH	MERCK
Fmoc-Dap(Alloc)-OH	NEOMPS
Fmoc-Gln(Trt)-OH	NOVABIOCHEM
Fmoc-Glu(tBu)-OH	FLUKA
Fmoc-Gly-OH	NOVABIOCHEM
Fmoc-Gly(alil)-OH	NEOMPS
Fmoc-Ile-OH	NEOSYSTEM
Fmoc-Leu-OH	BACHEM
Fmoc-Lys(Boc)-OH	NEOMPS
Fmoc-Met-OH	MERCK
Fmoc-Nle-OH	IRIS BIOTECH
FmocOSu	NeoMPS
Fmoc-Pra-OH	NEOMPS
Fmoc-Pro-OH	NEOSYSTEM
Fmoc-Ser(tBu)-OH	NEOMPS
Fmoc-Val-OH	BACHEM
HCTU	GL BIOCHEM
HOAt	ALDRICH
HOBt	ALDRICH
H-Ser-OH·HCl	BACHEM
Imidazol	FLUKA
KN(TMS) ₂ 1.0 M en THF	ALDRICH
Mel	ALDRICH
Na	PANREAC
NaCl	PANREAC
NaHCO ₃	PANREAC

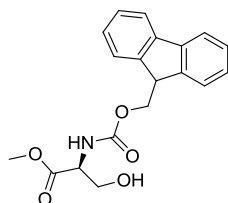
NaI	PANREAC
NaN(TMS) ₂ 1.0 M en THF	ALDRICH
Na ₂ SO ₄ anhidro	PANREAC
(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-(+)- <i>N</i> -Boc-6-oxo-2,3-difenilmorfolinona	ALDRICH
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-(+)- <i>N</i> -Boc-6-oxo-2,3-difenilmorfolinona	ALDRICH
NH ₃	PANREAC
NH ₄ Cl	PANREAC
Pd(C) al 10%	FLUKA
Pd(PPh ₃) ₄	ALDRICH
PhSiH ₃	ALDRICH
Piperidina	ALDRICH
P ₂ O ₅	PANREAC
PPh ₃	ALDRICH
PyAOP	ALDRICH
Resina Rink Amida HMBA	GS BIOCHEM
Resina DOWEX 50Wx8	FLUKA
TEA	ALDRICH
TFA	FLUKA
TIPS	ALDRICH
Trifluoroetanol	ALDRICH
TMSBr	ALDRICH

Los péptidos **2.01** (Ac-PEIIQSVGISMKM-NH₂) y **2.45** (Ac-KIIPKVQGMSIMS-NH₂) fueron suministrados por la empresa Peptide Protein Research Ltd. (Hampshire, Reino Unido).

Todos los aminoácidos empleados pertenecen a la serie natural *L*, salvo que se indique lo contrario.

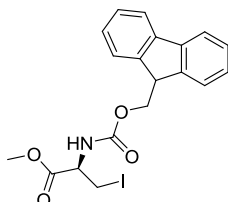
4.3. Preparación de los productos de partida de disolución

Fmoc-Ser-OMe (1.27)¹

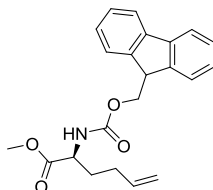


A una disolución de H-Ser-OMe·HCl (1 g, 8.65 mmol) y NaHCO₃ (1.83 g, 21.8 mmol) en H₂O (15 mL) enfriada a 0 °C, se adiciona lentamente una disolución de FmocOSu (2.90 g, 8.65 mmol) en 1,4-dioxano (15 mL) durante 30 min. Se deja agitando vigorosamente la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 24 h, verificando el pH periódicamente para mantenerlo en torno a 8. Entonces se añaden 15 mL de H₂O y se extrae con AcOEt (4 x 20 mL). Las fases orgánicas se lavan con una disolución acuosa de HCl 0.2 N (2 x 10 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (1 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El residuo final se recrystaliza en hexano:AcOEt (1:2) para obtener 2.24 g (76%) de un sólido blanco en forma de agujas que se identifica como **1.27**². **P.f.** 126-127 °C. $[\alpha]_D^{25} +6.9^\circ$ (c 1.10, CHCl₃); $[\alpha]_D^{25}$ (bibli.²) -7.3° (c 1.10, CHCl₃) de su enantiómero. **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (m, 2H, β -CH₂), 4.23 (t, 1H, α -CH, $J = 6.6$ Hz), 4.44 (m, 3H, CH₂-Fmoc, CH-Fmoc), 5.73 (d, 1H, OH, $J = 7.2$ Hz), 7.32 (t, 2H, H_{2,7}-Fmoc, $J = 7.5$ Hz), 7.41 (t, 2H, H_{3,6}-Fmoc, $J = 7.2$ Hz), 7.61 (d, 2H, H_{1,8}-Fmoc, $J = 6.9$ Hz), 7.77 (d, 2H, H_{4,5}-Fmoc, $J = 7.5$ Hz).

Fmoc-(R)-Ser(I)-OMe (1.28)²

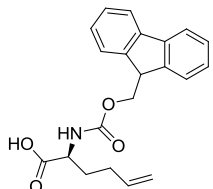


A una disolución de PPh₃ (630.8 mg, 2.4 mmol) e imidazol (163.39 mg, 2.4 mmol) en DCM (2.5 mL) a 0 °C se añade I₂ (609 mg, 2.4 mmol) en pequeñas porciones y posteriormente una disolución de **1.27** (684 mg, 2.0 mmol) en DCM (5 mL) gota a gota. La suspensión se agita vigorosamente a 0 °C durante 1 h y posteriormente a temperatura ambiente durante 3 h. Se concentra la mezcla de reacción a presión reducida, se disuelve el residuo en hexano:AcOEt, 1:1 y se filtra sobre gel de sílice. Se concentra el filtrado y el residuo resultante se recrystaliza (hexano:EtOH, 2:1), obteniéndose 554 mg (61%) de un sólido blanco que se identifica como **1.28**². **P.f.** 153-154 °C. (bibli.²) 153-154 °C. $[\alpha]_D^{25} +5.0^\circ$ (c 1.0, AcOEt); $[\alpha]_D^{25}$ (bibli.³) $+5.2^\circ$ (c 1.0, AcOEt). **¹H-RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 3.61 (d, 2H, β -CH₂, $J = 3.8$ Hz), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 4.25 (t, 1H, α -CH, $J = 7.2$ Hz), 4.41 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.59 (m, 1H, CH-Fmoc), 5.67 (d, 1H, HN, $J = 7.5$ Hz), 7.33 (t, 2H, H_{2,7}-Fmoc, $J = 7.5$ Hz), 7.42 (t, 2H, H_{3,6}-Fmoc, $J = 7.5$ Hz), 7.62 (d, 2H, H_{1,8}-Fmoc, $J = 7.5$ Hz), 7.77 (d, 2H, H_{4,5}-Fmoc, $J = 7.5$ Hz).

Fmoc-Hag-OMe (1.29)

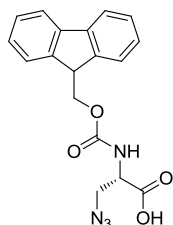
Una mezcla de Zn en polvo (714 mg, 10.92 mmol) y I_2 (27.9 mg, 0.11 mmol) se calienta durante 10 minutos purgando con ciclos de Ar/vacío (3 veces). Entonces se añade con jeringa lentamente una disolución de 1.28 (1.64 g, 3.64 mmol) en DMF anhidra (5 mL) a 0°C. Tras finalizar la adición, se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente y se agita durante 3 h más. A continuación, se adiciona la mezcla de reacción bajo

atmósfera de Ar sobre una disolución de cloruro de alilo (386 μ L, 4.73 mmol) y CuBr·SMe₂ activo (97 mg, 0.47 mmol) en DMF anhidra (4 mL) a -15 °C preparada previamente. Tras mantener la reacción a temperatura ambiente durante 24 h, se añade AcOEt (25 mL) y se agita durante 15 minutos. Entonces, se añade más AcOEt (50 mL) y la fase orgánica se lava con una disolución acuosa de Na₂S₂O₃ 1 M (3 x 15 mL), H₂O (3 x 15 mL) y una disolución saturada de NaCl (1 x 20 mL), se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se concentra el filtrado a presión reducida. El residuo final se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (pentano:AcOEt, 7:1), obteniéndose 330 mg (25%) de un aceite incoloro que se identifica como **1.29**. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.76 (m, 1H, β -CH₂), 2.01 (m, 3H, β -CH₂, γ -CH₂), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 4.21 (t, 1H, α -CH, J = 7.0 Hz), 4.39 (m, 3H, CH-Fmoc, CH₂-Fmoc), 5.01 (dd, 2H, CH₂ vinílicos, J = 16.3, 9.6 Hz), 5.27 (d, 1H, HN, J = 8.8 Hz), 5.77 (m, 1H, CH vinílico), 7.30 (t, 2H, H_{2,7}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.39 (t, 2H, H_{3,6}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.58 (d, 2H, H_{1,8}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.75 (d, 2H, H_{4,5}-Fmoc, J = 7.5 Hz).

Fmoc-Hag-OH (1.26)³

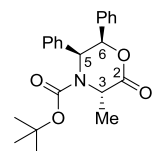
El compuesto **1.28** (315 mg, 0.86 mmol) se añade a una disolución 1.6 M de CaCl₂ en ¹PrOH:H₂O (7:3, 8 mL). Sobre esta disolución se añade una disolución acuosa de NaOH 1.0 M (8 mL). Tras agitar la reacción a temperatura ambiente 24 h, se neutraliza la reacción con una disolución de ácido acético al 10%.

Se concentra la mezcla, se disuelve en MeOH (5 mL) y se añade H₂O (15 mL). El sólido blanco que precipita se filtra, se lava abundantemente con H₂O y se seca a vacío obteniéndose 200 mg (66%) de un sólido blanco que se identifica como **1.26³**. P.f. 179-180 °C (hexano:DCM, 1:1). HPLC Analítico (Agilent, gradiente 2): t_R = 8.74 min (98% pureza). $[\alpha]^{25}_D$ +7.40 ° (c 1.0, CHCl₃); $[\alpha]^{25}_D$ (bibli.³) +13.32 ° (c 1.0, CHCl₃). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.78 (m, 1H, β -CH₂), 1.89-2.20 (m, 3H, β -CH₂, γ -CH₂), 4.21 (t, 1H, α -CH, J = 7.0 Hz), 4.42 (m, 3H, CH-Fmoc, CH₂-Fmoc), 5.04 (dd, 2H, CH₂ vinílicos, J = 16.3, 9.6 Hz), 5.21 (m, 1H, HN, J = 8.8 Hz), 5.78 (m, 1H, CH vinílico), 7.30 (t, 2H, H_{2,7}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.39 (t, 2H, H_{3,6}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.58 (d, 2H, H_{1,8}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.75 (d, 2H, H_{4,5}-Fmoc, J = 7.5 Hz). EM (ESI positivo) m/z : 390.2 [M+K]⁺ (80%), 374.2 [M+Na]⁺ (40%).

Fmoc-Dap(N₃)-OH (1.40)⁴

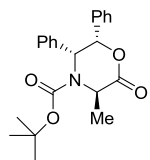
A una disolución de Fmoc-Dap-OH (250 mg, 0.8 mmol) en ácido acético acuoso al 80% (2.5 mL), se añade CuSO₄ (2.6 mg, 0.016 mmol) en H₂O (300 μ L). Tras ajustar el pH de la disolución a 9-10 usando K₂CO₃, se añaden H₂O (4 mL), MeOH (9 mL) y una disolución de azida de trifluorometanosulfonilo (1.5 mmol) en DCM recién preparada⁵. Tras agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 h, se concentra a presión reducida, se redissuelve el residuo en DCM (10 mL) y se lava con H₂O (2 x 5 mL).

Las fases acuosas se juntan, se acidifican hasta pH = 2 usando una disolución acuosa de HCl 1N y se extraen con DCM (2 x 5 mL). Las fases orgánicas se juntan, se secan sobre Mg₂SO₄ anhidro y se concentra el filtrado a presión reducida. El residuo final se purifica por CCTLC en el Cromatotrón (DCM:MeOH, 20:1) obteniéndose 190 mg (70%) de un sólido amarillento que se identifica como **1.40**⁴. **P.f.** 180 °C (desc.). **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 8.24 min (> 98% pureza). $[\alpha]_D^{25} +30.4^\circ$ (c 1.0, CHCl₃). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.46-3.59 (m, 1H, β -CH₂), 3.60-3.75 (m, 1H, β -CH₂), 3.92 (m, 1H, α -CH), 4.27 (m, 3H, CH₂-Fmoc, CH-Fmoc), 6.89 (d, 1H, NH, J = 6.4 Hz), 7.33 (t, 2H, H_{2,7}-Fmoc, J = 7.6 Hz), 7.42 (t, 2H, H_{3,6}-Fmoc, J = 7.6 Hz), 7.71 (d, 2H, H_{1,8}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.90 (t, 2H, H_{4,5}-Fmoc, J = 7.4 Hz). **EM** (ESI positivo) m/z : 375.2 [M+Na]⁺ (100%), 353.2 [M+H]⁺ (20%).

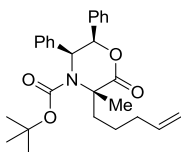
Síntesis asimétrica de los Fmoc-aminoácidos (S)-2.02 y (R)-2.05.**(3S,5S,6R)-5,6-difenil-4-(*tert*-butoxicarbonil)-3-metil-2,3,5,6-tetrahidro-4H-1,4-oxazin-2-ona (2.14)⁶**

A una disolución de (5S,6R)-5,6-difenil-4-(*tert*-butoxicarbonil)-2,3,5,6-tetrahidro-4H-1,4-oxazin-2-ona (**2.12**, 203 mg, 0.57 mmol) y yoduro de metilo (365 μ L, 5.86 mmol) en THF seco (4 mL) a -78°C bajo atmósfera de Ar, se añade gota a gota una disolución 1.0 M de NaN(TMS)₂ (610 μ L, 0.61 mmol) en THF durante 45 min. La mezcla de

reacción se agita a -78 °C durante 1 h, se vierte sobre H₂O y se extrae con AcOEt (3 x 15 mL). Se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash (HPFC) en un equipo Biotage SP1 (hexano:AcOEt, 5:1) obteniéndose 168 mg (80%) de un sólido blanco que se identifica como **2.14**⁶. **P.f.** 201-202 °C (hexano:AcOEt, 4:1). (bibli.⁷.) 202-204 °C. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 9.91 min (> 98% pureza). $[\alpha]_D^{25} -65.5^\circ$ (c 0.2, DCM); $[\alpha]_D^{25}$ (bibli.⁶) -61.0 ° (c 0.2, DCM). **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.04 (s, 6H, tBu), 1.40 (s, 3H, tBu), 1.71 (m, 3H, α -CH₃), 4.89 (m, 1H, α -CH), 5.15 (m, 1H, bencílico), 6.26 (m, 1H, bencílico), 6.52 (m, 2H, Ar), 7.00-7.34 (m, 8H, Ar).

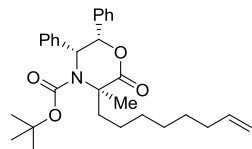
(3*R*,5*R*,6*S*)-5,6-difenil-4-(*tert*-butoxicarbonil)-3-metil-2,3,5,6-tetrahidro-4*H*-1,4-oxazin-2-ona (2.15)⁶

Siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **2.14**, se hace reaccionar una disolución de (5*R*,6*S*)-5,6-difenil-4-(*tert*-butoxicarbonil)-2,3,5,6-tetrahidro-4*H*-1,4-oxazin-2-ona (**2.13**, 438 mg, 1.24 mmol) y yoduro de metilo (787 μ L, 12.6 mmol) en THF seco (12 mL) con una disolución 1.0 M de $\text{NaN}(\text{TMS})_2$ en THF (610 μ L, 0.61 mmol) durante 40 min. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en un equipo Biotage SP1 (hexano:AcOEt, 5:1) obteniéndose 370 mg (81%) de un sólido blanco que se identifica como **2.15**⁶. **P.f.** 198-199 °C (hexano:AcOEt, 4:1). **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 9.90 min (> 98% pureza). $[\alpha]_D^{25} +67.0^\circ$ (c 0.2, DCM); $[\alpha]_D^{25} -65.5^\circ$ (c 0.2, DCM) de su enantiómero. **¹H-RMN** (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.04 (s, 6H, tBu), 1.40 (s, 3H, tBu), 1.65-1.76 (m, 3H, α -CH₃), 4.98-4.80 (q, J = 7.3 Hz, 1H, α -CH), 5.05-5.27 (m, 1H, bencílico), 6.23-6.30 (m, 1H, bencílico), 6.47-6.56 (m, 2H, Ar), 7.00-7.31 (m, 8H, Ar).

(3*S*,5*S*,6*R*)-5,6-difenil-4-(*tert*-butoxicarbonil)-3-metil-3-(4'-pentenil)-2,3,5,6-tetrahidro-4*H*-1,4-oxazin-2-ona (2.18)

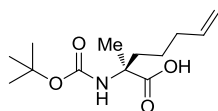
A una disolución de **2.14** (166 mg, 0.45 mmol) y 1-yoduro de 4-pentenilo recién preparado⁷ (**2.16**, 2.26 mmol, 5.0 eq.) en THF seco (6 mL) a -40 °C y bajo atmósfera de Ar, se añade gota a gota una disolución 1.0 M de $\text{KN}(\text{TMS})_2$ en THF (900 μ L, 0.9 mmol) durante 10 minutos. Se agita a -40 °C durante 35 min. A continuación, se vierte la mezcla sobre AcOEt (10 mL), se lava con H₂O (3 x 15 mL) y una disolución saturada de NaCl (1 x 15 mL). Se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El residuo final se purifica por CCTLC en el Comatotrón (hexano:AcOEt, 5:1) obteniéndose 116 mg (59%) de un aceite incoloro que se identifica como **2.18**. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 11.31 min (92% pureza). $[\alpha]_D^{25} +25.2^\circ$ (c 3.1, DCM). **¹H-RMN** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.04-1.85 (m, 14H, C _{β} H₂, α -CH₃, tBu), 2.07 (q, 2H, γ -CH₂ alílico, J = 7.0 Hz), 2.50 (m, 8H, α -CH₂), 5.03 (m, 2H, ϵ -CH₂ vinílico), 5.81 (dtd, 1H, δ -CH vinílico, J = 6.8, 6.6, 3.3 Hz), 6.23 (d, 2H, CH-Ph, J = 3.2 Hz), 6.87 (sa, 2H, Ar), 7.07-7.32 (m, 8H, Ar). **¹³C-RMN** (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 23.8 (β -CH₂), 28.7 (CH₃, tBu, Boc), 33.8 (γ -CH₂), 64.2 (CH, CHPh), 115.7 (ϵ -CH₂), 126.0, 128.0, 128.5, 129.3, 135.6, 135.9, (C-Ar), 138.1 (δ -CH), 151.7 (C=O, Boc), 173.2 (C=O, lactona). **EM** (ESI positivo) m/z : 458.3 [M+Na]⁺ (100%), 336.3 [M-Boc]⁺ (80%), 195.1 [M-(1,2-difenil-1-hidroxietano)]⁺ (70%). **Análisis elemental** (%) calculado para C₂₇H₃₃NO₄: C 74.45, H 7.64, N 3.22; encontrado C 74.16, H 7.91, N 3.49.

(3*R*,5*R*,6*S*)-5,6-difenil-4-(*terc*-butoxicarbonil)-3-metil-3-(7'-octenil)-2,3,5,6-tetrahidro-4*H*-1,4-oxazin-2-ona (2.19)



Siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto **2.18**, se hace reaccionar una disolución de **2.15** (235 mg, 0.64 mmol) y 1-yoduro de 4-pentenilo recién preparado⁷ (**2.17**, 1.94 mmol, 3.0 eq.) en THF seco (8 mL) con una disolución 1.0 M de KN(TMS)₂ en THF (1.30 mL, 1.30 mmol, 2.0 eq.) durante 45 minutos. El residuo final se purifica por CCTLC en el Cromatotrón (hexano:AcOEt, 6:1) obteniéndose 170 mg (56%) de un sólido blanco amorfo que se identifica como **2.19**. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 12.26 min (> 98% pureza). $[\alpha]_D^{25}$ -29.0 ° (c 3.4, DCM). **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 1.16-1.90 (m, 20H, β-CH₂, γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂, α-CH₃, tBu), 1.95-2.34 (m, 3H, CH₂ alílico, C_αH₂), 2.50 (m, 1H, C_αH₂), 4.94 (m, 2H, CH₂ vinílico), 5.78 (dtd, 1H, CH vinílico, J = 6.9, 6.6, 3.3 Hz), 5.96 (d, 2H, bencílicos, J = 3.1 Hz), 6.86-7.43 (m, Ar, 10H). **¹³C-RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 25.1 (β-CH₂), 28.6, 28.9 (CH₃, ¹Bu-Boc), 29.1 (γ-CH₂), 29.6 (δ-CH₂), 33.4 (CH₂ alílico), 39.3 (α-CH₂), 41.4 (α-CH₂), 64.2 (C, C_α), 80.6 (CH, bencílico), 81.2 (C, Boc), 82.0 (CH, bencílico), 114.5 (CH₂ vinílico), 125.9, 127.9, 128.4, 129.1 (CH-Ar), 135.5 (C-Ar), 135.9 (C-Ar), 139.1 (CH, vinílico), 152.6 (C=O, Boc), 154.1 (C=O, Boc), 173.2 (C=O, lactona). **EM** (ESI positivo) m/z : 378.3 [M-Boc]⁺ (100%), 500.3 [M+Na]⁺ (90%). **Análisis elemental** (%) calculado para C₃₀H₃₉NO₄ C 75.44, H 8.23, N 2.92; encontrado C 75.23, H 8.51, N 3.12.

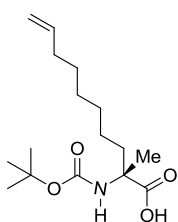
Boc-α-(4'-pentenil)-(S)-Ala-OH (2.20)



Sobre una mezcla de Na (237 mg, 10.38 mmol) en THF seco (6 mL) saturada con NH₃, a -78 °C se añade gota a gota una disolución de **2.18** (348 mg, 0.81 mmol) en THF seco (9 mL) y EtOH absoluto (600 μL). Tras dejar que la reacción alcance -33 °C en 30 minutos, se añade NH₄Cl en exceso y se deja que la mezcla alcance la temperatura ambiente. Se añade H₂O (3 mL), se extrae con Et₂O (1 x 9 mL), se acidifica la fase acuosa hasta pH = 2 con una disolución de HCl 3 N y se extrae con AcOEt (3 x 9 mL). Se juntan las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se concentran a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón (DCM:MeOH, 95:5) obteniéndose 90 mg de (S)-**2.20** (43%) como un sólido blanco. **P.f.** 97-98 °C (DCM). **HPLC Analítico** (Agilent; gradiente 2): t_R = 7.87 min (83% pureza). $[\alpha]_D^{25}$ + 12.7 ° (c 2.1, DCM). **¹H-RMN** (400 MHz, acetona-*d*₆): δ 1.29-1.60 (m, 14H, α-CH₃, β-CH₂, Boc), 1.84 (td, 1H, γ-CH₂, J = 12.5, 5.0 Hz), 1.94-2.10 (m, 7H, acetona, γ-CH₂, α-CH₂), 4.96 (m, 2H, CH₂ vinílico), 5.79 (m, 1H, CH₂ vinílico), 5.80 (dtd, 1H, CH vinílico, J = 10.3, 6.7, 6.0 Hz), 6.06 (sa, 1H, NH). **¹³C-RMN** (100 MHz, acetona-*d*₆): δ 24.3 (α-CH₃), 28.7 (CH₃, Boc), 34.6 (γ-CH₂), 37.0 (α-CH₂), 62.5 (C, C_α), 78.9 (C, Boc), 115.0 (CH₂, vinílicos), 139.6 (CH, vinílico), 155.2 (C=O, Boc). **EM**

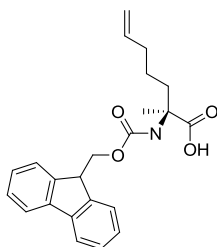
(ESI positivo) m/z : 280.0 $[M+Na]^+$ (100%), 180.1 $[M-Boc+H]^+$ (40%), 224.1 $[M-alilo+H]^+$ (50%).

Boc- α -(7'-octenil)-(*R*)-Ala-OH (2.21)



Se sigue el procedimiento descrito para **2.20** partiendo de **2.19** (300 mg, 0.63 mmol). El residuo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón (DCM:MeOH, 95:5) obteniéndose 108 mg (57%) de un sólido blanco que se identifica como (*R*)-**2.21**. **P.f.** 180-181 °C (hexano). **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 9.50 min (> 98% pureza). $[\alpha]_D^{25}$ -6.5 ° (c 0.9, DCM). **1H -RMN** (400 MHz, acetona- d_6): δ 1.25-1.52 (m, 21H, β -CH₂, α -CH₃, γ -CH₂, δ -CH₂, ϵ -CH₂, ω -CH₂, tBu), 1.84 (m, 1H, CH₂ alílico), 1.94-2.14 (m, 6H, acetona, α -CH₂, CH₂ alílico), 4.94 (m, 2H, CH₂ vinílico), 5.80 (m, 1H, CH vinílico), 5.99 (sa, 1H, NH carbamato). **^{13}C -RMN** (100 MHz, acetona- d_6): δ 23.55 (α -CH₃), 24.6 (β -CH₂), 28.6 (CH₃, Boc), 29.6 (γ -CH₂, C₈H₂), 30.3 (ϵ -CH₂), 34.5 (CH₂ alílico), 37.6 (α -CH₂), 59.8 (C, C α), 79.0 (C, Boc), 114.8 (CH₂ vinílicos), 139.9 (CH vinílico), 155.2 (C=O, Boc), 176.2 (C=O, ácido). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculado para C₁₆H₂₉NO₄ 299.2097; encontrada $[M+H]^+$ 300.2160. (-2.97 ppm)

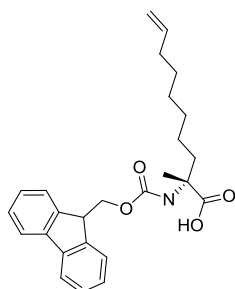
Fmoc- α -(4'-pentenil)-(*S*)-Ala-OH (2.02)⁸



Sobre una disolución de (*S*)-**2.20** (78 mg, 0.3 mmol) en DCM (1.5 mL) a 0 °C se añade TFA (1.5 mL). Tras agitar durante 30 min a esta temperatura, se concentra la mezcla a presión reducida con bomba de aceite. El crudo de reacción se disuelve en de H₂O:acetona (1:1, 9 mL) y se añaden Na₂CO₃ (96 mg, 0.9 mmol) y FmocOSu (111 mg, 0.33 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 16 h. Se lleva la mezcla a un valor de pH = 3 añadiendo HCl 0.1 N, se extrae con AcOEt (3 x 6 mL), se juntan las fracciones orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El crudo final se purifica por CCTLC en el Cromatotrón (DCM:MeOH, 95:5), obteniéndose 78 mg (69%) de una espuma que se identifica como (*S*)-**2.02**⁸. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 10.65 min (> 98% pureza). $[\alpha]_D^{25}$ +6.0 ° (c 1.1, DCM). **1H -RMN** (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.10-1.37 (m, 5H, α -CH₃, β -CH₂), 1.67 (m, 1H, γ -CH₂), 1.91 (m, 3H, γ -CH₂, α -CH₂), 4.21 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.29 (m, 1H, CH-Fmoc), 4.93 (m, 2H, CH₂ vinílicos), 5.73 (dtd, 1H, CH vinílico, J = 10.3, 6.7, 6.0 Hz), 6.94 (sa, 1H, NH), 7.32 (t, 2H, H_{2,7}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.41 (t, 2H, H_{3,6}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.65 (d, 2H, H_{1,8}-Fmoc, J = 7.5 Hz), 7.89 (d, 2H, H_{4,5}-Fmoc, J = 7.5 Hz). **^{13}C -RMN** (100 MHz, DMSO- d_6): δ 23.5 (C₈H₂), 28.9 (α -CH₃), 28.8 (CH₂), 33.5 (α -CH₂), 35.7 (γ -CH₂), 46.8 (CH-Fmoc), 58.9 (C, C α), 64.7

(CH₂-Fmoc), 114.4 (CH₂ vinílicos), 120.1 (C_{4,5}-Fmoc), 125.0 (C_{1,8}-Fmoc), 127.0, 127.5 (C_{2,7}-Fmoc, C_{3,6}-Fmoc), 138.9 (CH vinílico), 140.7, 143.9, 144.0 (C-Fmoc), 153.6 (C=O, Fmoc), 176.2 (C=O, ácido). **EM** (ESI positivo) *m/z*: 458.3 [M+K]⁺ (100%), 336.2 [M-(CH₂)₆CHCH₂+H]⁺ (100%), 380.2 [M- alilo+H]⁺ (60%), 195.1 [M- fulveno+H]⁺ (40%).

Fmoc-α-(7'-octenil)-(R)-Ala-OH (2.05)⁸



Se sigue el procedimiento descrito para **2.02** partiendo de (*R*)-**2.21** (100 mg, 0.30 mmol). El crudo final se purifica en columna de gel de sílice (hexano:acetona, 1:1), obteniéndose 67 mg (53%) de un aceite incoloro que se identifica como (*R*)-**2.05**⁸. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): *t_R* = 10.65 min (> 98% pureza). [α]_D²⁵ -6.8 ° (c 0.9, DCM). **¹H-RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.10-1.44 (m, 11H, β-CH₂, γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂, α-CH₃), 1.69 (m, 2H, α-CH₂), 1.99 (dt, 6.8 Hz, CH₂ alílico, *J* = 7.3 Hz), 4.22 (m, 3H, CH₂-Fmoc, CH-Fmoc), 4.96 (m, 2H, CH₂ vinílico), 5.77 (dtd, 1H, CH vinílico, *J* = 10.2, 6.6, 3.2 Hz), 7.32 (t, 2H, H_{2,7}-Fmoc, *J* = 7.5 Hz), 7.40 (t, 2H, H_{3,6}-Fmoc, *J* = 7.5 Hz), 7.71 (d, 2H, H_{1,8}-Fmoc, *J* = 7.5 Hz), 7.89 (d, 2H, H_{4,5}-Fmoc, *J* = 7.5 Hz), 12.40 (sa, 1H, ácido). **¹³C-RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 22.5 (α-CH₃), 23.2, 28.2, 28.4, 29.1 (β-CH₂, γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 33.17 (α-CH₂), 36.6 (CH₂ vinílico), 46.7 (CH-Fmoc), 58.3 (Cα, C), 65.2 (CH₂-Fmoc), 114.7 (CH₂ vinílico), 120.1, 125.3, 127.1, 127.6 (CH-Fmoc), 138.8 (CH, vinílico), 140.7, 143.9 (C-Fmoc), 154.7 (C=O, Fmoc), 175.4 (C=O, ácido). **EM** (ESI positivo) *m/z*: 458.3 [M+K]⁺ (100%), 336.2 [M-(CH₂)₆CHCH₂+H]⁺ (100%), 380.2 [M- alilo+H]⁺ (60%), 195.1 [M- fulveno+H]⁺ (40%).

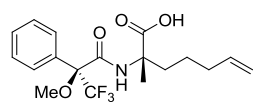
Determinación de la configuración absoluta de los Cα de (S)-2.02 y (R)-2.05.

A pesar de que los aminoácidos (S)-**2.02** y (R)-**2.05** se encuentran descritos en la bibliografía⁸, no hemos sido capaces de encontrar sus valores de pureza óptica en ninguna publicación hasta la fecha. Por tanto, con el fin de confirmar la estereoquímica del carbono estereogénico en los aminoácidos cuaternarios sintetizados en esta memoria, se lleva a cabo la determinación de la configuración absoluta de dichos aminoácidos mediante la preparación de sus correspondientes amidas de Mosher **2.22** - **2.25** acoplando cada uno de ellos con los dos enantiómeros del cloruro de Mosher⁹ siguiendo el procedimiento general que se indica a continuación¹⁰: a una disolución del Boc-aminoácido (5-10 mg) en DCM (500 μL) a 0 °C se añade TFA (500 μL). La mezcla se agita durante 30 min. a esta temperatura y se concentra a presión reducida con bomba de aceite. El residuo resultante se disuelve en DCM seco (1 mL), se enfría a 0 °C y se añaden Et₃N (4 eq.) y el cloruro de Mosher (1.5 eq.). Tras agitar la reacción a temperatura ambiente toda la noche, se concentra la mezcla, se disuelve el residuo en AcOEt (5 mL), se lava con una disolución de ácido cítrico 1 M (3 x 5 mL) y con una disolución saturada de NaCl (1 x 5 mL). La fase

orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se concentra a presión reducida. El crudo resultante se filtra con gel de sílice (DCM:MeOH, 20:1).

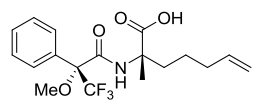
Los crudos finales resultantes se analizaron mediante RMN de ¹H y ¹⁹F (se muestran las señales representativas). La configuración absoluta de los carbonos α de los aminoácidos derivatizados fue establecida mediante comparación de los desplazamientos químicos de ¹H según está recogido en la bibliografía¹⁰. Todos los crudos fueron analizados por HPLC analítico. En todos los casos se confirmó la pureza óptica de la muestra determinando los excesos diastereoméricos (e.d.) de **2.22** - **2.25** en el espectro de ¹⁹F-RMN. Ello permitió extrapolar y determinar los excesos enantioméricos (ee) de los aminoácidos cuaternarios finales (S)- **2.02** y (R)-**2.05**, siendo en todos los casos superiores al 94%.

N-(S)-(2'-metoxi-2'-trifluorometil-fenilpropanilo)-α-(4''-pentenil)-(S)-Ala-OH ((S,S)-2.22)



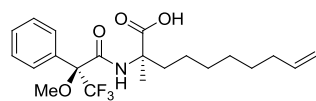
HPLC Analítico (Agilent, gradiente 2): *t_R* = 10.57 min. **e.d.** > 95%. **¹H-RMN** (500 MHz, CDCl₃): δ 1.19-1.30 (m, 7H, β-CH₂), 1.52 (s, 3H, α-CH₃), 1.91 (m, 2H, α-CH₂), 2.05 (dt, 2H, *J* = 7.2, 6.8 Hz, CH₂ alílico), 3.57 (m, 3H, OCH₃), 4.97 (m, 2H, CH₂ vinílico), 5.72 (dtd, 1H, CH vinílico, *J* = 10.4, 6.6, 3.2 Hz), 7.39 (m, 3H, H_{3,4,5}-Ar), 7.52 (m, 2H, H_{1,6}-Ar). **¹⁹F-RMN** (376.2 MHz, CDCl₃): δ -72.4 (CF₃). **HRMS** (ESI negativo) *m/z*: Calculado para C₁₈H₂₂F₃NO₄ 373,1501; encontrada [M-H]⁻ 372.1390 (-3.3 ppm).

N-(R)-(2'-metoxi-2'-trifluorometil-fenilpropanilo)-α-(4''-pentenil)-(S)-Ala-OH ((R,S)-2.23)



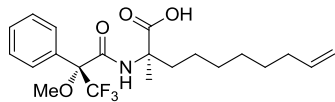
HPLC Analítico (Agilent, gradiente 2): *t_R* = 10.55 min. **e.d.** 94%. **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 1.14-1.35 (m, 5H, β-CH₂), 1.34-1.56 (m, 5H, α-CH₃), 1.90 (m, 2H, α-CH₂), 2.05 (dt, 2H, CH₂ alílico, *J* = 7.4, 6.8 Hz), 3.54 (m, 3H, OCH₃), 4.98 (m, 2H, CH₂ vinílico), 5.73 (dtd, *J* = 10.2, 6.6, 3.2 Hz, 1H, CH vinílico), 7.42 (m, 3H, H_{3,4,5}-Ar), 7.55 (m, 2H, H_{1,6}-Ar). **¹⁹F-RMN** (376.2 MHz, CDCl₃): δ -72.3 (CF₃). **HRMS** (ESI positivo) *m/z*: Calculado para C₁₈H₂₂NO₄F₃ 373.1501; encontrada [M+Na-H₂O]⁺ 356.1418 (-2.97 ppm).

N-(S)-(2'-metoxi-2'-trifluorometil-fenilpropanilo)-α-(7''-octenil)-(R)-Ala-OH ((S,R)-2.24)



HPLC Analítico (Agilent, gradiente 2): *t_R* = 10.18 min. **e.d.** > 95%. **¹H-RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 1.12-1.40 (m, 22H, β-CH₂, γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂), 1.50 (m, 9H, α-CH₃), 1.88 (m, 2H, α-CH₂), 2.01 (m, dt, 2H, CH₂, alílico, *J* = 7.2, 6.8 Hz), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 4.94 (m, 2H, CH₂ vinílico), 5.77 (dtd, 1H, CH vinílico, *J* = 10.2, 6.7, 3.3 Hz), 7.40 (m, 3H, H_{3,4,5}-Ar), 7.52 (m, 2H, H_{1,6}-Ar). **¹⁹F-RMN** (376.2 MHz, CDCl₃): δ -72.3 (CF₃). **HRMS** (ESI negativo) *m/z*: Calculado para C₂₁H₂₈F₃NO₄ 415,1970; encontrada 414.1845, [M-H]⁻ (-4.7 ppm).

***N*-(*R*)-(2'-metoxi-2'-trifluorometil-fenilpropanilo)- α -(7''-octenil)-(*R*)-Ala-OH ((*R,R*)-2.25)**



HPLC Analítico (Agilent, gradiente 2): $t_R = 10.20$ min. **e.d.** > 95%. **$^1\text{H-RMN}$** (500 MHz, CDCl_3): δ 0.93-1.89 (m, 24H, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$, $\epsilon\text{-CH}_2$, $\alpha\text{-CH}_3$, $\alpha\text{-CH}_2$), 1.97 (m, 2H, CH_2), 3.38 (s, 3H, OCH_3), 4.92 (m, 2H, CH_2 vinílico), 5.76 (m, 1H, CH vinílico), 7.34 (m, 3H, $\text{H}_{3,4,5}\text{-Ar}$), 7.50 (m, 2H, $\text{H}_{1,6}\text{-Ar}$). **$^{19}\text{F-RMN}$** (376.2 MHz, CDCl_3): δ -69.1 (CF_3). **HRMS** (ESI negativo) m/z : Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{NO}_4$ 415.1970; encontrada 414.1850 $[\text{M-H}]^-$ (0.5 ppm).

4.4. Protocolos generales en fase sólida

4.4.1. Seguimiento de las reacciones en fase sólida

- *Ensayo de ninhidrina o de Kaiser*¹¹.

Permite evaluar cualitativamente la extensión de los acoplamientos sobre aminas primarias.

Procedimiento general: A una alícuota de resina seca (3-4 mg) se le añaden 6 gotas del reactivo A y 3 gotas del reactivo B, calentándose la mezcla a 110 °C durante 3 minutos. Una coloración azul o azul-verdosa de la resina o el sobrenadante indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo), mientras que una coloración amarilla indica ausencia de aminas primarias (ensayo negativo).

Reactivo A: Se disuelven 40 mg de fenol en 10 mL de EtOH absoluto en caliente. Por otro lado se prepara una disolución de 65 mg de KCN en 100 mL de H₂O y se diluyen 2 mL de esta disolución en 100 mL de piridina. Ambas disoluciones se agitan por separado con 4 g de resina Amberlite MB-3 durante 45 minutos. Seguidamente se filtran y se mezclan los dos filtrados.

Reactivo B: Se disuelve ninhidrina (2.5 g) en EtOH absoluto (50 mL). La disolución se almacena protegida de la luz, preferiblemente bajo atmósfera inerte.

- *Ensayo de cloranilo*¹²

El ensayo del cloranilo cualitativo se utiliza para evaluar la extensión de los acoplamientos peptídicos sobre aminas secundarias. El procedimiento consiste en preparar una disolución saturada de cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) en tolueno (750 mg en 25 mL). A una alícuota de resina lavada y seca se adicionan 5 gotas de la disolución de cloranilo y 15 gotas de acetona, agitándose la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una coloración azul-verdosa de la resina indica la existencia de aminas secundarias libres (ensayo positivo), mientras que una coloración amarilla indica la ausencia de éstas (ensayo negativo).

- *Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS)*

La monitorización cuantitativa se ha llevado a cabo mediante análisis por HPLC-MS. Para ello, se trata una pequeña porción de peptidil-resina (5-10 mg) con una disolución ácida de desanclaje (composición dependiente de la naturaleza del péptido) durante al menos 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se recoge el filtrado así como los posteriores lavados con DCM, se concentra a presión reducida y se disuelve el crudo final en CH₃CN, H₂O y/o MeOH (hasta 1.5 mL) para ser analizado por HPLC-MS.

4.4.2. Protocolos generales en la síntesis de péptidos lineales en fase sólida mediante estrategia Fmoc/tBu

La síntesis de los péptidos descritos en la presente memoria se ha llevado a cabo manualmente en fase sólida utilizando una estrategia Fmoc/tBu. Todas las

reacciones fueron realizadas sobre jeringas de polipropileno provistas de filtro de polietileno poroso de 2, 20 o 60 mL, dependiendo de la cantidad de resina de partida. Para realizar los distintos tratamientos se mantiene la matriz sólida dentro de la jeringa y se añade una cantidad de reactivo/disolvente suficiente para cubrir e hinchar totalmente el polímero. La agitación del soporte polimérico se realizó con una varilla de teflón en los lavados y sobre un agitador orbitálico durante las reacciones, si no se indica lo contrario. Los excesos de reactivos, disolvente, y subproductos formados en el transcurso de la reacción son eliminados por ciclos de filtración/lavado con nuevo disolvente a vacío en un sistema-bloque de síntesis de 20 posiciones conectado a vacío especial para fase sólida. Este bloque de síntesis contiene en la parte delantera una válvula que permite controlar la presión, y en la parte trasera, un orificio que permite vaciar los residuos líquidos de los lavados.

4.4.2.1. Soporte polimérico

Como único soporte polimérico se empleó una resina del tipo *MBHA-PS* (1% DVB) de carga 0.47 mmol/g, común para todos los productos sintetizados, funcionalizada con el espaciador de tipo amida *Rink*.

4.4.2.2. Determinación de la carga de la resina tras la unión del primer aminoácido

Una vez finalizado el anclaje del primer aminoácido a la resina según el protocolo general (Tabla PE1), se procede a determinar la nueva funcionalización de la resina. Para ello, en tres viales distintos se pesa entre 1 y 3 mg de peptidil-resina secada previamente con bomba de aceite. A cada uno de ellos se adicionan 3 mL de una disolución de piperidina al 20% en DMF recién preparada. La suspensión se agita ocasionalmente con pipeta de plástico durante al menos 30 minutos. Entonces se mide la absorbancia a 290 nm de cada una de las suspensiones de los tres viales.

Con los datos de absorbancia obtenidos, se calcula para cada caso la carga experimental usando la Ecuación 1:

$$\text{Carga experimental (mmol/g)} = (\text{Abs}_{\text{muestra}}) / (\text{mg de muestra} \times 1.75) \quad [1]$$

donde,

- **Abs**, es la medida de absorción de la disolución con la resina en suspensión a 290 nm.
- **mg de muestra**, es la cantidad de Fmoc-aminoacil-resina pesada (entre 1-3 mg).
- **1.75**, es un factor derivado del coeficiente de extinción molar del aducto piperidina-fulveno ($5253 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La carga experimental final determinada es la media de las tres medidas independientes. En todos los casos, el nuevo grado de funcionalización de la resina fue similar a la carga de la resina de partida ($0.47 \pm 0.04 \text{ mmol/g}$).

4.4.2.3. Elongación de la cadena peptídica en fase sólida

La elongación de la cadena peptídica de los péptidos lineales fue realizada siguiendo la estrategia general que recoge en la Tabla PE1.

Tabla PE1 | Protocolo general de elongación de péptidos lineales en fase sólida siguiendo estrategia Fmoc/tBu.

Etapas	Reactivos	Operación	Tiempo	Temperatura
1	DCM/DMF/DCM/DMF	Hinchado	4 x 0.5 min	t.a.
2	20% piperidina en DMF*	Eliminación grupo Fmoc	1 x 1 min 3 x 10 min	t.a.
3	DMF/DCM/DMF/DCM	Lavado	4 x 0.5 min	t.a.
4	Fmoc-AA-OH/agente acoplamiento	Acoplamiento	métodos A, B ó C	métodos A, B ó C
5	DMF/DCM/DMF/DCM	Lavado	4 x 0.5 min	t.a.
6	Ensayos ninhidrina/cloranilo/HPLC-MS	Control	-	110 °C ó t.a.

* En los péptidos anclados a la resina con 6 o más residuos, se utilizó como mezcla de desprotección del extremo N-terminal una disolución de DBU:piperidina:DMF, 1:1:48 en volumen.

A continuación, se detallan alguna de las etapas de este procedimiento general:

Métodos de acoplamiento (etapa 4)

Una vez hinchada la resina y eliminado el grupo Fmoc lleva a cabo la reacción de acoplamiento aminoacídico siguiendo tres métodos:

- **Método A:** sobre la resina hinchada se añade una disolución de Fmoc-AA-OH (4 eq.), HOBT (4 eq.) y DIC (4 eq.) disueltos en una mínima cantidad de DMF anhidra. La reacción se mantiene durante 12 h sobre agitador orbital a temperatura ambiente.
- **Método B:** sobre la resina hinchada se añade una disolución de Fmoc-AA-OH (2 eq.), HCTU (2 eq.) y DIEA (4 eq.) disueltos en una mínima cantidad de DMF anhidra. La reacción se mantiene durante 2 h sobre agitador orbital a temperatura ambiente.
- **Método C:** se trasvasa la resina hinchada con una pipeta de plástico a un vial especial de microondas de 2-5 ó 5-10 mL provisto con un núcleo de agitación lenta. Entonces se añade una disolución de Fmoc-AA-OH (1.2 eq.), HCTU (1.2 eq.) y DIEA (2.4 eq.) disueltos en una cantidad mínima de DMF anhidra. Se sella el vial y la mezcla se calienta en un sintetizador de microondas, a 40 °C y durante 10 minutos. La adición de una nueva mezcla de acoplamiento se repitió dos veces más, eliminando el sobrenadante y añadiendo nueva mezcla de acoplamiento cada vez.

Lavados de la resina (etapas 3/5)

Tras llevar a cabo cualquier reacción sobre el soporte polimérico, la mezcla heterogénea del medio de reacción se filtra a vacío en el sistema-bloque de 20 posiciones con el fin de eliminar los excesos de reactivo así como los posibles productos secundarios de reacción. En primer lugar se añade disolvente en el que se haya llevado a cabo la reacción (DMF en la mayoría de los casos). Posteriormente, se añade DCM como disolvente en el que se hincha el soporte polimérico. En todos los casos, tras añadir cualquier disolvente, se agita 30 segundos, se filtra y se repite este ciclo cuatro veces con el mismo disolvente. Después se cambia al otro disolvente. En total se lava cuatro veces el soporte polimérico (dos ciclos de cuatro con cada uno de los disolventes, de forma alterna).

En el caso de reacciones catalizadas por metales (Ru, Pd, Cu), se requiere de lavados especiales que se indican a continuación:

- *Eliminación de Ru mediante lavado.*

Tras llevar a cabo una reacción de metátesis en presencia de catalizador de Ru, se deja la peptidil-resina toda la noche con una mezcla de DCM:DMSO, 1:1 en volumen. Por último, se realiza un lavado estándar.

- *Eliminación de Pd y Cu mediante lavado.*

La peptidil-resina (procedente de un crudo de reacción en la que se ha empleado cobre o paladio como catalizador) situada en una jeringa de polipropileno, se lava por filtración, y en este orden, con:

- *Uso de Pd:* DCM/DMF/ $\text{Et}_2\text{NCS}_2\text{Na}$ 0.2 M en DMF/DMF/DCM (4 x 0.5 min).
- *Uso de Cu:* DMF/ $\text{Et}_2\text{NCS}_2\text{Na}$ 0.2 M en DMF/ H_2O /DMF/DCM (4 x 0.5 min).

4.4.2.4. Acetilación de aminas.

En la síntesis en fase sólida de péptidos es común acetilar los extremos aminos libres una vez acabada la síntesis. El protocolo general a seguir en este caso se indica en la Tabla PE2.

Tabla PE2 | Protocolo general de acetilación de aminas en fase sólida.

Etapas	Reactivos	Operación	Tiempo	Temperatura
1	DCM/DMF/DCM/DMF	Hinchado	4 x 0.5 min	t.a.
2	20% piperidina en DMF	Eliminación grupo Fmoc	1 x 1 min 3 x 10 min	t.a.
3	DMF/DCM/DMF/DCM	Lavado	4 x 0.5 min	t.a.
4	Ac ₂ O:DIEA:DMF 1:1:1	Acetilación	1 x 1 min 4 x 10 min	t.a.
5	DMF/DCM/DMF/DCM	Lavado	4 x 0.5 min	t.a.
6	Ensayos ninhidrina/cloranilo/HPLC-MS	Control	-	110°C ó t.a.

4.4.2.5. Eliminación de los grupos protectores aliloxycarbonilo (Alloc) y grupos alilo (OAl).

Sobre la peptidil-resina hinchada en DCM seco, se añade una disolución de Pd(PPh₃)₄ (0.25 eq.) y PhSiH₃ (24 eq.) disueltos en la mínima cantidad de DCM. Se cierra el sistema, se purga con Ar y se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Se lava con DCM un par de veces y se repite de nuevo la reacción. Por último, se lava la resina a vacío (ver apartado 4.4.2.3, eliminación de Pd mediante lavado).

4.4.2.6. Desanclaje de la resina y sedimentación de los péptidos.

Para desanclar los péptidos de la fase poliestirénica se emplea una mezcla ácida de desanclaje dependiente de la secuencia peptídica:

- Péptidos sin Met.

Sobre la peptidil-resina seca en una jeringa de polipropileno se añaden 6-8 volúmenes de una mezcla de desanclaje formada por TFA:TIPS:H₂O en proporciones 95:2.5:2.5 en volumen. Se cierra la jeringa y se agita sobre agitador orbital a temperatura ambiente durante 4 h. La fase soluble se añade sobre Et₂O frío en dos tubos Falcon de 50 mL. Se repite el lavado de la resina con TFA y DCM un par de veces, precipitándose cantidades adicionales de péptido sobre Et₂O frío.

- Péptidos que contienen Met.

Sobre la peptidil-resina seca en una jeringa de polipropileno se añaden 6-8 volúmenes de una mezcla de desanclaje formada por TFA:TIPS:EDT en proporciones 95:2.5:2.5 en volumen. Se cierra la jeringa bajo argón y se agita sobre agitador orbital a temperatura ambiente durante 4 h. A falta de 15 minutos de cumplirse el tiempo, se añaden TMSBr (13.0 µL/mL disolvente; concentración final de 0.1 M) y EDT (15.7 µL/mL disolvente; concentración final de 0.2 M). La fase soluble se añade sobre Et₂O frío en dos tubos Falcon de 50 mL para precipitar el péptido. Se repite el lavado de la

resina con TFA y DCM un par de veces, precipitándose cantidades adicionales de péptido sobre Et₂O frío en todos los casos.

Por último, se centrifugan las fases solubles a 5000 rpm durante 10 minutos tres veces, eliminando el sobrenadante por decantación y añadiendo Et₂O nuevo cada vez. El precipitado seco obtenido se disuelve en una mezcla de H₂O y CH₃CN y se liofiliza para obtener el crudo final.

4.4.2.7. Purificación de los péptidos.

Los péptidos descritos en esta memoria se purificaron mediante cromatografía en fase reversa empleando diferentes gradientes de H₂O y CH₃CN utilizando los tres métodos cromatográficos que se detallan en los métodos generales. En todos los casos, la pureza final de los productos se determinó mediante HPLC analítico, y se indica entre paréntesis junto con el gradiente utilizado.

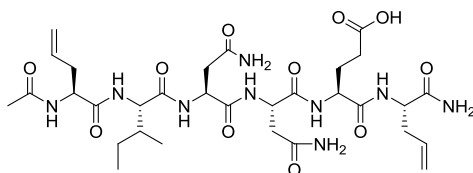
4.5. Síntesis y caracterización de inhibidores de la dimerización de la TI del VIH-1

4.5.1. Péptidos lineales y cíclicos con puentes hidrocarbonados.

4.5.1.1. Síntesis de los péptidos lineales 1.22 - 1.24.

Procedimiento general: la síntesis de los péptidos lineales de referencia se lleva a cabo a partir de 0.02-0.04 mmol de soporte polimérico siguiendo el protocolo general de elongación (apartado 4.4.2.2) usando como aminoácidos Fmoc-Hag-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH y Fmoc-Gly(alil)-OH según corresponda en cada caso, para obtener finalmente los péptidos lineales protegidos en su forma Fmoc anclados a la resina **1.25**, **1.30** y **1.31**. Posteriormente se lleva a cabo la acetilación del extremo N-terminal (apartado 4.4.2.4) y el desanclaje del péptido de la resina según el protocolo general (apartado 4.4.2.6). El crudo final se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage (0% inicial de A hasta 100% final de A).

Ac-[Gly(alil)-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly(alil)]-NH₂ (1.22)

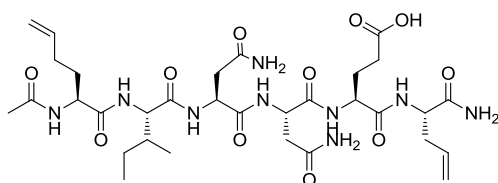


Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.04 mmol de resina se sintetiza el péptido lineal anclado a la resina **1.25** utilizando DIC/HOBt como agente de acoplamiento (método A). Tras acetilar, desanclar el péptido del soporte polimérico y purificar, se obtienen 7 mg (24%

rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido **1.22** tras liofilizar. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 3.27 min (> 98% pureza).

HRMS (ESI positivo) m/z : Calculada para C₃₁H₄₉N₉O₁₁ 723.3552; encontrada [M+H]⁺ 724.3591 (-4.63 ppm). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.80 (m, 6H, δ-CH₃ Ile2, γ-CH₃ Ile2), 1.04 (m, 1H, 1H γ-CH₂ Ile2), 1.10-1.28 (m, 2H), 1.32-1.42 (m, 2H), 1.58-1.74 (m, 2H), 1.74-1.96 (m, 3H), 3.96-4.18 (m, 2H, HA), 4.36 (m, 1H, HA), 4.44 (m, 1H, HA), 4.50 (m, 1H, HA), 5.04 (m, 4H, δ-CH₂ vinílico Gly1, Gly6), 5.68 (m, 2H, γ-CH vinílico Gly1, Gly6), 6.90 (m, 1H, CONH₂), 6.97 (m, 2H, CONH₂), 7.04 (m, 1H, CONH₂), 7.34-7.58 (m, 2H, HN), 7.73 (m, 1H, HN), 8.04 (m, 1H, HN), 8.10 (m, 2H, HN).

Ac-[Hag-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly(alil)]-NH₂ (1.23)

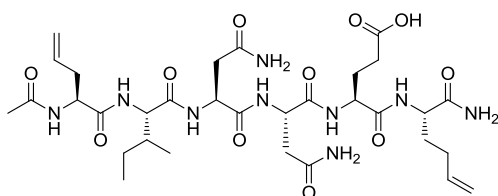


Según el procedimiento general, a partir de 0.02 mmol de resina se sintetiza el péptido lineal anclado a la resina **1.30** utilizando HCTU como agente de acoplamiento (método B). Tras acetilar, desanclar el péptido del soporte

polimérico y purificar, se obtienen 2.2 mg (15% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido **1.23** tras liofilizar. **HPLC analítico**

(Agilent, gradiente 2): t_R = 4.66 min (95% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para $C_{32}H_{51}N_9O_{11}$ 737.3708; encontrada $[M+H]^+$ 738.3726 (-4.21 ppm). **1H -RMN** (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ 0.81 (m, 6H, δ -CH₃ Ile2, γ -CH₃ Ile2), 1.07 (m, 2H, 1H γ -CH₂ Ile2), 1.40 (m, 2H, γ -CH₂ Ile2, β -CH₂ Hag1), 1.54 (m, 1H), 1.69-1.93 (m, 5H, β -CH Ile2, Ac, β -CH₂ Glu5), 2.03 (m, 3H, γ -CH₂ Hag6, β -CH₂ Glu5), 2.26 (m, 2H, γ -CH₂ Glu5, β -CH₂ Gly6), 3.95-4.19 (m, 3H, α -CH Gly6, α -CH Hag1, α -CH Glu5), 4.27 (m, 1H, α -CH Ile2), 4.37-4.58 (m, 2H, α -CH Asn3, α -CH Asn4), 5.03 (m, 4H, δ -CH₂ vinílico Gly6, ϵ -CH₂ vinílico Hag1), 5.75 (m, 2H, γ -CH vinílico Gly6, δ -CH vinílico Hag1), 6.93 (m, 2H, CONH₂), 7.02 (m, 2H, CONH₂), 7.37-7.61 (m, 2H), 7.75 (m, 2H), 8.00-8.14 (m, 2H).

Ac-[Gly(alil)-Ile-Asn-Asn-Glu-Hag]-NH₂ (1.24)



A partir de 0.04 mmol de resina, se sintetiza el péptido lineal anclado a la resina **1.22** utilizando HCTU como agente de acoplamiento siguiendo el procedimiento general (método B). Tras acetilar, desanclar el péptido del soporte polimérico y purificar, se obtienen 3.9 mg

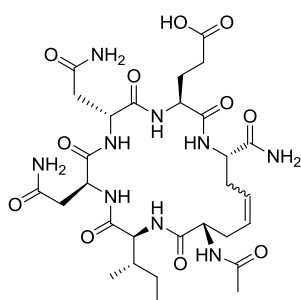
(13% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido **1.24** tras liofilizar. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 4.61 min (> 98% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para $C_{32}H_{51}N_9O_{11}$ 737.3708; encontrada $[M+H]^+$ 738.3810 (3.93 ppm). **1H -RMN** (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ 0.82 (m, 6H, δ -CH₃ Ile2, γ -CH₃ Ile2), 1.08 (m, 1H, γ -CH₂ Ile2), 1.40 (m, 2H, γ -CH₂ Ile2, β -CH₂ Hag6), 1.59-1.92 (m, 5H, β -CH Ile2, Ac, β -CH₂ Glu5), 2.03 (m, 3H, γ -CH₂ Hag6, β -CH₂ Glu5), 2.23 (m, 2H, γ -CH₂ Glu5, β -CH₂ Gly1), 3.95 (m, 1H, α -CH Hag6), 4.06 (m, 1H, α -CH Ile2), 4.14 (m, 1H, α -CH, Glu5), 4.36 (m, 2H, α -CH Gly1, α -CH Asn), 4.52 (m, 1H, α -CH Asn), 5.01 (m, 4H, δ -CH₂ vinílico Gly1, ϵ -CH₂ vinílico Hag6), 5.73 (m, 2H, γ -CH vinílico Gly1, δ -CH vinílico Hag6), 6.93 (m, 1H, CONH₂), 6.97 (m, 1H, CONH₂), 7.06 (m, 1H, CONH₂), 7.42 (sa, 1H, CONH₂), 7.79 (m, 2H, HN Ile2, HN Glu5), 8.01 (m, 1H, HN Gly1), 8.12 (m, 2H, HN Asn3, HN Asn4).

4.5.1.2. Síntesis de los péptidos cíclicos **1.13** - **1.17** mediante reacción de metátesis.

Procedimiento general: Sobre un vial de microondas con el péptido lineal anclado a la resina protegido en forma de Fmoc (1 eq.) previamente hinchada, se añade bajo campana de argón el catalizador de Grubbs de segunda generación (0.2 eq.). Se cierra el vial y se añade DCM seco (10 volúmenes) y un 10% en volumen de una disolución de LiCl 4.0 M en DMF. Se burbujea la disolución con argón durante 5 minutos. La mezcla se calienta en un sintetizador de microondas a 100 °C durante 1 h. La peptidil-resina se lava según se indica en el apartado 4.4.2.3 de lavado de la resina (ver eliminación de Ru mediante lavado). Posteriormente, se elimina el grupo Fmoc del

extremo N-terminal, se acetila y se desancla de la resina según el protocolo general descrito (apartado 4.4.2.6). El crudo final se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage (0% inicial de A hasta 20% final de A).

Ac-ciclo(CH₂-CH=CH-CH₂)^{1,6}-[Gly-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly]-NH₂ (1.13)



A partir de 0.10 mmol del péptido anclado a la resina **1.25** en su forma Fmoc se lleva a cabo la reacción de metátesis siguiendo el procedimiento general descrito. El crudo final liofilizado (80 mg) se purifica, obteniéndose tras liofilizar, 18.2 mg (20% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como la mezcla *E/Z* de los dicarba análogos **1.13** en una proporción 66:44 determinada por HPLC. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 3): *t_R* = 12.86 min. (mayoritario), 12.49 min. (minoritario) (> 98% pureza). **HRMS** (ESI positivo)

m/z: Calculado para C₂₉H₄₅N₉O₁₁ 695.3239; encontrada [M+H]⁺ 696.3456 (-1.48 ppm).

Tabla PE3 | Desplazamientos químicos (ppm) de ¹H y de ¹³C (cursiva) del isómero mayoritario A del péptido cíclico **1.13***.

Residuo	NH	α-CH	β-CH	Otros
Gly1	8.28	4.40 (56.8)	2.57, 2.49 (32.7)	Ac 1.99 (24.2) γ-CH 5.56
Ile2	8.81	4.47 (61.8)	1.95 (40.0)	δ-CH ₃ 0.88 (13.6) γ-CH ₃ 0.93 (17.7) γ-CH ₂ 1.33, 1.18 (26.5)
Asn3	8.73	4.69 (53.4)	2.88** (38.0)	CONH ₂ 7.89
Asn4	8.26	4.68 (53.5)	3.01, 2.94 (38.0)	CONH ₂ 7.82
Glu5	8.98	4.22 (58.0)	2.08, 2.04 (29.2)	γ-CH ₂ 2.42, 2.29 (36.6) γ-CH 5.59
Gly6	8.07	4.46 (55.7)	QB 2.59 (31.9)	CONH ₂ terminal 7.41, 7.25

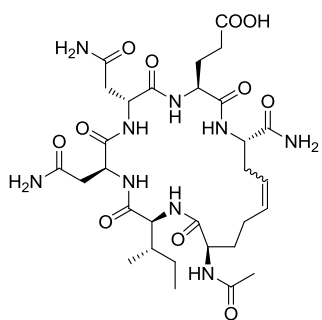
*Los espectros de ¹H y ¹³C se han adquirido en disolución de D₂O:H₂O 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ¹³C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Tabla PE4 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del isómero minoritario B del péptido cíclico **1.13***.

Residuo	NH	$\alpha\text{-CH}$	$\beta\text{-CH}$	Otros
Gly1	8.20	4.37 (56.2)	2.60, 2.51 (-)	Ac 2.00 (24.1) $\gamma\text{-CH}$ 5.67 $\delta\text{-CH}_3$ 0.88 (-) $\gamma\text{-CH}_3$ 0.92 (-) $\gamma\text{-CH}_2$ 1.17, 1.36 (-)
Ile2	8.47	4.33 (61.5)	1.96 (39.4)	CONH ₂ -
Asn3	8.73	4.67 (53.4)	2.94, 2.86 (38.4)	CONH ₂ 7.74, 7.03
Asn4	8.63	4.67 (54.5)	2.93, 2.85 (38.3)	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.27, 2.28 (-)
Glu5	8.54	4.28 (57.5)	2.10, 1.99 (-)	$\gamma\text{-CH}$ 5.53
Gly6	7.75	4.35 (55.8)	2.59, 2.45 (-)	CONH ₂ terminal 7.41

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en disolución de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm.

Ac-ciclo(CH₂-CH₂-CH=CH-CH₂)^{1,6}-[Gly-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly]-NH₂ (1.14)



A partir de 0.28 mmol del péptido anclado a la resina **1.30** en su forma Fmoc se lleva a cabo la reacción de metátesis siguiendo el procedimiento general descrito. El crudo final liofilizado (123 mg) se purifica, obteniéndose tras liofilizar, 20 mg (20% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como la mezcla *E/Z* de los dicarba análogos **1.14** en una proporción 51:49 determinada por HPLC. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 4): t_R = 10.82, 11.16 min (> 98% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_9\text{O}_{11}$ 709.3395; encontrada $[\text{M}+\text{H}]^+$ 710.3494 (3.6 ppm).

Tabla PE5 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del isómero A del péptido cíclico **1.14***.

Residuo	NH	$\alpha\text{-CH}$	$\beta\text{-CH}$	Otros
Gly1	8.46	4.30 (-)	1.75** (33.7)	Ac 2.02 (24.4) $\gamma\text{-CH}_2$ 2.11 (30.9) $\delta\text{-CH}$ 5.58 $\delta\text{-CH}_3$ 0.86 (12.7) $\gamma\text{-CH}_3$ 0.91 (17.4) $\gamma\text{-CH}_2$ 1.48, 1.23 (27.2)
Ile2	8.77	4.18 (61.6)	1.88 (38.6)	CONH ₂ 7.02
Asn3	8.87	4.61 (53.8)	2.96, 2.81 (38.3)	CONH ₂ -
Asn4	8.77	4.49 (54.3)	3.00, 2.75 (38.1)	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.29, 2.21 (36.1)
Glu5	8.37	4.35 (57.0)	2.07, 1.98 (29.8)	$\gamma\text{-CH}$ 5.46
Gly6	7.93	4.41 (55.7)	2.58, 2.38 (36.9)	CONH ₂ terminal 7.56, 7.24

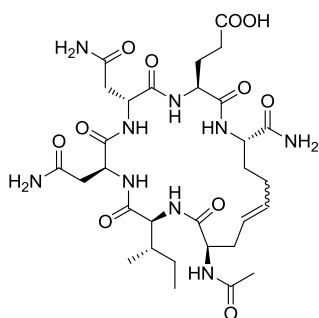
*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en disolución de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Tabla PE6 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del isómero B del péptido cíclico **1.14***.

Residuo	NH	$\alpha\text{-CH}$	$\beta\text{-CH}$	Otros
Gly1	8.41	4.32 (56.2)	1.72**(34.1)	Ac 2.01 (24.2) $\gamma\text{-CH}_2$ 2.26, 1.93 (25.7) $\delta\text{-CH}$ 5.74
Ile2	9.14	4.20 (61.4)	1.88 (-)	$\delta\text{-CH}_3$ 0.84 (-) $\gamma\text{-CH}_3$ 0.91 (-) $\gamma\text{-CH}_2$ 1.20, 1.24 (-)
Asn3	8.55	4.49 (-)	3.00, 2.79 (38.2)	CONH ₂ -
Asn4	9.19	4.55 (54.0)	2.97, 2.77 (38.2)	CONH ₂ -
Glu5	9.13	4.19 (57.9)	2.07, 1.88 (28.9)	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.37, 2.27 (36.1)
Gly6	7.46	4.47 (54.9)	2.69, 2.56 (31.1)	$\gamma\text{-CH}$ 5.34 CONH ₂ terminal 7.31

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en disolución de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí..

Ac-ciclo($\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2$)^{1,6}-[Gly-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly]-NH₂ (**1.15**)



A partir de 0.18 mmol del péptido anclado a la resina **1.31** en su forma Fmoc se lleva a cabo la reacción de metátesis siguiendo el procedimiento general descrito. Parte del crudo final liofilizado (64 de 114 mg) se purifica, obteniéndose tras liofilizar, 17.8 mg (20% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como la mezcla *E/Z* del dicarba análogo **1.15** en una proporción 51:49 determinada por HPLC.

HPLC analítico (Agilent, gradiente 2): t_R = 3.31 min, 3.48 min (> 98% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z :

Calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_9\text{O}_{11}$ 709.3395; encontrada $[\text{M}+\text{H}]^+$ 710.3470 (0.2 ppm).

Tabla PE7 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del isómero A péptido cíclico **1.15***.

Residuo	NH	$\alpha\text{-CH}$	$\beta\text{-CH}$	Otros
Gly1	8.12	4.32 (56.1)	2.50** (37.0)	Ac 2.00 (24.3) $\gamma\text{-CH}$ 5.24 $\delta\text{-CH}_3$ 0.86 (-)
Ile2	8.33	4.43 (61.5)	1.86 (38.3)	$\gamma\text{-CH}_3$ 0.92 (17.3) $\gamma\text{-CH}_2$ 1.22, 1.51 (26.8)
Asn3	8.61	4.11 (54.5)	2.89, 3.06 (37.7)	CONH ₂ 7.04, 7.84
Asn4	8.81	4.01 (56.1)	2.82, 3.05 (37.7)	CONH ₂ 7.00, 7.74
Glu5	9.22	4.44 (-)	1.91, 2.12 (29.2)	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.24** (-)
Gly6	8.71	4.48 (55.6)	1.83, 1.93 (32.5)	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.00, 2.19 (30.7) $\delta\text{-CH}$ 5.56 CONH ₂ terminal 7.23, 7.63

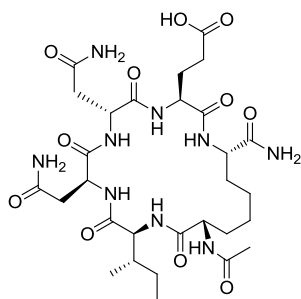
*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en disolución de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Tabla PE8 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del isómero B péptido cíclico **1.15***.

Residuo	NH	$\alpha\text{-CH}$	$\beta\text{-CH}$	Otros
Gly1	8.33	4.43 (-)	2.31** (32.2)	Ac 1.99 (24.2) $\gamma\text{-CH}$ 5.45 $\delta\text{-CH}_3$ 0.88 (12.5)
Ile2	8.80	4.01 (62.0)	1.84 (37.8)	$\gamma\text{-CH}_3$ 0.92 (-) $\gamma\text{-CH}_2$ 1.26, 1.55 (27.8)
Asn3	8.71	4.48 (54.8)	2.86, 2.98 (38.3)	CONH ₂ 7.02, 7.88
Asn4	8.69	4.50 (54.5)	2.85, 2.91 (38.3)	CONH ₂ 7.74
Glu5	7.85	4.45 (-)	1.98, 2.07 (29.1)	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.23, 2.31 (36.1) $\gamma\text{-CH}_2$ 2.01, 2.11 (25.8)
Gly6	8.20	4.22 (54.6)	1.80, 1.93 (33.1)	$\delta\text{-CH}$ 5.52 CONH ₂ terminal 7.24, 7.66

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en disolución de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Ac-ciclo(CH₂)₄^{1,6}-[Gly-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly]-NH₂ (1.16)



Sobre una disolución de crudo del péptido insaturado **1.13** (0.07 mmol, 48 mg) en MeOH anhidro (4 mL) se añade en frío Pd/C al 10% (48 mg). La mezcla de reacción se agita bajo atmósfera de H₂ (1 atm) a temperatura ambiente durante 24 h. Se filtra sobre celita y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en el *Biotage* (0% inicial de A a 20% de A final) obteniéndose, tras liofilizar, 9.8 mg (20% rendimiento global) de un sólido blanco

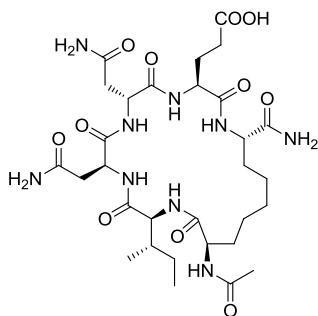
algodonoso que se identifica como el péptido saturado **1.16**. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): *t_R* = 3.92 min (> 98% pureza). **HRMS** (ESI positivo) *m/z*: Calculado para C₂₉H₄₇N₉O₁₁ 697.3395; encontrada [M+H]⁺ 698.8434 (2.38 ppm).

Tabla PE9 | Desplazamientos químicos (ppm) de ¹H y de ¹³C (cursiva) del péptido cíclico **1.16***.

Residuo	NH	α-CH	β-CH	Otros
Gly1	8.39	4.25 (56.9)	1.74, 1.77 (33.8)	Ac 1.99 (24.1) γ-CH ₂ 1.41, 1.87 (27.1) δ-CH ₃ 0.86 (13.2)
Ile2	8.64	4.30 (61.3)	1.94 (39.0)	γ-CH ₃ 0.92 (17.6) γ-CH ₂ 1.20, 1.42 (27.0)
Asn3	8.27	4.65 (53.4)	2.96** (38.8)	δ-NH ₂ 7.07, 7.82
Asn4	8.70	4.57 (54.6)	2.86, 2.90 (38.4)	δ-NH ₂ 7.03, 7.74
Glu5	8.41	4.33 (59.9)	1.99, 2.11 (29.3)	γ-CH ₂ 1.98, 2.27 (36.4)
Dap6	7.82	4.23 (56.3)	1.73, 1.75 (33.1)	γ-CH ₂ 1.41, 1.87 (27.1) CONH ₂ terminal: 7.24, 7.54

*Los espectros de ¹H y ¹³C se han adquirido en disolución de D₂O:H₂O 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ¹³C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Ac-ciclo(CH₂)₅^{1,6}-[Gly-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly]-NH₂ (1.17)



Siguiendo el procedimiento descrito para **1.16**, sobre una disolución de crudo del péptido **1.14** (0.12 mmol, 50 mg) en MeOH/EtOH 4:1 anhidro (4 mL), se añade Pd/C al 10%. El residuo final se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en el *Biotage* (0% inicial de A a 20% de A final) obteniéndose, tras liofilizar, 15.4 mg (18% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido saturado **1.17**. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 3.50 min (> 98% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para C₃₀H₄₉N₉O₁₃ 711.3542; encontrada [M+H]⁺ 712.3620 (-0.67 ppm).

Tabla PE10 | Desplazamientos químicos (ppm) de ¹H y de ¹³C (cursiva) del péptido cíclico **1.17***.

Residuo	NH	α -CH	β -CH	Otros
Gly1	8.35	4.28 (56.6)	1.74, 1.68 (33.2)	Ac 1.99 (24.1) γ -CH ₂ 1.41 (30.2) δ -CH ₂ 1.39 (27.1) δ -CH ₃ 0.86 (12.8)
Ile2	8.63	4.17 (61.4)	1.89 (38.4)	γ -CH ₃ 0.91 (27.2) γ -CH ₂ 1.47, 1.21 (17.5)
Asn3	8.53	4.53 (54.1)	2.96, 2.89 (38.5)	CONH ₂ 7.82, 7.05
Asn4	8.65	4.57 (54.5)	2.92, 2.86 (38.5)	CONH ₂ 7.73, 7.01
Glu5	8.32	4.39 (56.5)	2.12, 1.93 (29.5)	γ -CH ₂ 2.24 (36.3) γ -CH ₂ 1.30 (30.1)
Gly6	8.02	4.31 (56.2)	1.82, 1.75 (33.5)	CONH ₂ terminal: 7.60, 7.22

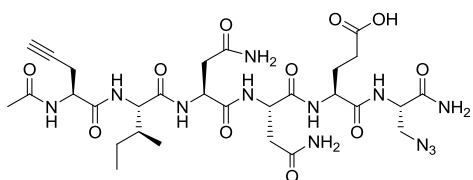
*Los espectros de ¹H y ¹³C se han adquirido en disolución de D₂O:H₂O 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ¹³C se ha realizado hasta 65 ppm.

4.5.2. Péptidos lineales y cíclicos con puentes de 1,2,3-triazol.

4.5.2.1. Síntesis de los péptidos lineales **1.38** y **1.39**.

Procedimiento general: la síntesis de los péptidos lineales de referencia se lleva a cabo a partir de 0.08-0.1 mmol de resina HMBA tipo amida Rink siguiendo el protocolo general de elongación (apartado 4.4.2.3) usando como agente de acoplamiento HCTU/DIEA (método B) y como aminoácidos Fmoc-Pra-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH y Fmoc-Dap(N₃)-OH según corresponda en cada caso, para obtener, los péptidos lineales protegidos en su forma Fmoc anclados a la resina **1.41** y **1.42**, para obtener, tras llevar a cabo la acetilación del extremo N-terminal (apartado 4.4.2.4), se lleva a cabo el desanclaje del péptido de la resina según el protocolo general (apartado 4.4.2.6). El crudo final se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage (0% inicial de A hasta 100% final de A).

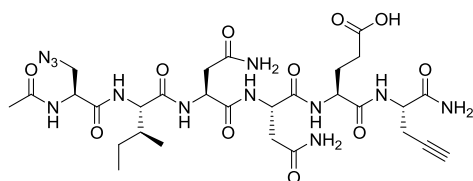
Ac-[Pra-Ile-Asn-Asn-Glu-Dap(N₃)]-NH₂ (**1.38**)



Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.1 mmol de resina MBHA tipo amida Rink, se obtienen, tras purificar y liofilizar, 2.8 mg (7% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido **1.38**. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R : 4.01

min (90% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para C₂₉H₄₄N₁₂O₁₁ 736.3253; encontrada [M+H]⁺ 737.3293 (-3.52 ppm). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.80 (m, 6H, δ -CH₃, γ -CH₃ Ile2), 1.03 (m, 1H, γ -CH₂ Ile2), 1.39 (m, 1H, γ -CH₂ Ile2), 1.70 (m, 1H, β -CH Ile2), 1.81 (m, 1H, β -CH₂ Glu5), 1.86 (s, 3H, Ac), 1.98 (m, 1H, β -CH₂ Glu5), 2.29 (m, 2H, γ -CH₂ Glu5), 2.81 (t, 1H, δ -CH Pra1, J = 2.5 Hz), 3.57 (m, 2H, β -CH₂ Pra1), 4.15 (m, 2H, α -CH Ile2, α -CH₂ Glu5), 4.33 (m, 1H, α -CH Dap6), 4.42-4.58 (m, 3H, α -CH Asn3, α -CH Asn4, α -CH Pra1), 6.97 (m, 2H, CONH₂), 7.19 (s, 1H, CONH₂), 7.30 (s, 1H, CONH₂), 7.45 (m, 2H, CONH₂), 7.84 (d, 1H, HN Ile2, J = 8.5 Hz), 8.11 (m, 3H, HN Asn3, HN Asn4, HN Dap6), 8.22 (m, 2H, HN Glu5, HN Pra1), 12.08 (sa, 1H, COOH Glu5).

Ac-[Dap(N₃)-Ile-Asn-Asn-Glu-Pra]-NH₂ (**1.39**)



Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.08 mmol de resina MBHA tipo amida Rink, se obtienen, tras purificar y liofilizar, 4.7 mg (9% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido **1.39**. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R : 4.04 min (90% pureza). **HRMS** (ESI positivo)

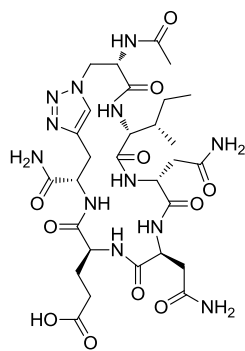
m/z : Calculada para C₂₉H₄₄N₁₂O₁₁ 736.3253; encontrada [M+H]⁺ 737.3315 (-1.51 ppm). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.81 (m, 6H, δ -CH₃, γ -CH₃ Ile2), 1.03 (m, 1H, γ -CH₂ Ile2), 1.39 (m, 1H, γ -CH₂ Ile2), 1.71 (m, 1H, β -CH Ile2), 1.81 (m, 1H, β -CH₂ Glu5), 1.88

(s, 3H, Ac), 1.95 (m, 1H, β -CH₂ Glu5), 2.28 (m, 1H, γ -CH₂ Glu5), 2.59 (m, 1H, β -CH₂ Pra6), 2.63 (m, 1H, β -CH₂ Asn), 2.78 (t aparente, 1H, δ -CH Pra6, $J = 2.6$ Hz), 3.41 (m, 1H, β -CH₂ Dap1), 3.52 (dd, 1H, β -CH₂ Dap1, $J = 4.5, 12.7$ Hz), 4.09-4.20 (m, 2H, α -CH Ile2, α -CH Glu5), 4.25 (m, 1H, α -CH Dap1), 4.44-4.57 (m, 2H, α -CH Asn3, α -CH Asn4), 4.61 (td, 1H, α -CH Pra6, $J = 4.5, 8.2$ Hz), 6.93 (m, 1H, CONH₂), 6.98 (m, 1H, CONH₂), 7.11 (sa, 1H, CONH₂), 7.19 (sa, 1H, CONH₂), 7.43 (m, 1H, CONH₂), 7.46 (m, 1H, CONH₂), 8.01 (m, 2H, HN Ile2, Dap1), 8.07 (s, 1H, HN Asn, $J = 7.5$ Hz), 8.10-8.18 (m, 2H, HN Glu5, Asn), 8.22 (m, 1H, HN Ile2), 8.29 (d, 1H, HN Pra6, $J = 8.0$ Hz), 8.35 (d, 1H, HN Asn, $J = 7.5$ Hz), 12.07 (sa, 1H, COOH Glu5).

4.5.2.2. Síntesis de los péptidos cíclicos **1.18** y **1.19**

Procedimiento general: En un vial de microondas se añade el péptido lineal acetilado **1.44** y **1.45** anclado a la resina (1 eq.) y una disolución de piperidina en DMF al 20% en volumen (5 volúmenes). Sobre esta suspensión se añade CuI (0.25 eq.) y ascorbato sódico (0.5 eq.). El vial se sella y se burbujea Ar hasta que la disolución adquiere un color amarillo-verde manzana. A continuación, se irradia a 100 °C durante 1 h en un reactor de microondas. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente. La peptidil-resina se lava por filtrado según el protocolo general (ver eliminación de Cu, apartado 4.4.2.3) y se procede al lavado de la peptidil-resina según el protocolo general. Por último, se lleva a cabo el desanclaje del producto de la resina según el método general (apartado 4.4.2.6). El crudo final se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage (0% inicial de A hasta 100% final de A).

Ac-ciclo[CH₂-(1,4-[1,2,3]triazolil)-CH₂]^{1,6}-[Gly-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly]-NH₂ (**1.18**)



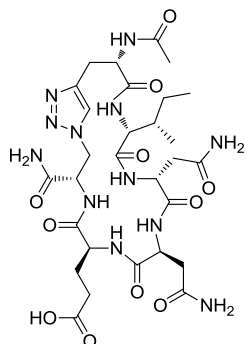
Sobre la peptidil-resina **1.44** (0.08 mmol) se lleva a cabo la reacción de cicloadición 1,3-dipolar según el procedimiento anteriormente descrito. Tras purificar y liofilizar, se obtienen 5.5 mg (11% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como **1.18**. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R : 2.07 min (87% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para C₂₉H₄₄N₁₂O₁₁ 736.3253; encontrada [M+H]⁺ 737.3319 (-0.83 ppm).

Tabla PE12 | Desplazamientos químicos (ppm) de ¹H y de ¹³C (cursiva) del péptido cíclico **1.18***

Residuo	NH	α -CH	β -CH	Otros
Gly1	8.55	4.84 (-)	4.72** (36.85)	Ac (24.3)
Ile2	8.63	4.23 (61.3)	1.84 (38.39)	δ -CH ₃ 0.85 (12.9) γ -CH ₃ 0.91 (17.5) γ -CH ₂ 1.16, 1.43 (27.1)
Asn3	8.82	4.54 (55.2)	2.88** (38.39)	CONH ₂ 7.04, 7.82
Asn4	8.55	4.61 (54.6)	2.85** (38.43)	CONH ₂ 6.98, 7.68
Glu5	8.23	4.33 (56.6)	2.03, 1.80 (29.85)	γ -CH ₂ 2.19 (36.2) HD 7.93
Gly6	8.14	4.72 (53.6)	3.32, 3.13 (29.85)	CONH ₂ terminal 7.33, 7.64

*Los espectros de ¹H y ¹³C se han adquirido en disolución de D₂O:H₂O 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ¹³C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Ac-ciclo{CH₂-(4,1-[1,2,3]-triazolil)-CH₂}1.30^{1,6}-[Gly-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly]-NH₂ (1.19)



Sobre la peptidil-resina **1.45** (0.07 mmol) se lleva a cabo la reacción de cicloadición 1,3-dipolar según el procedimiento anteriormente descrito. Tras purificar y liofilizar, se obtienen 5 mg (11% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como **1.19**. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): *t_R*: 2.02 min (94% pureza). **HRMS** (ESI positivo) *m/z*: Calculada para C₂₉H₄₄N₁₂O₁₁ 736.3253; encontrada [M+H]⁺ 737.3337 (1.83 ppm).

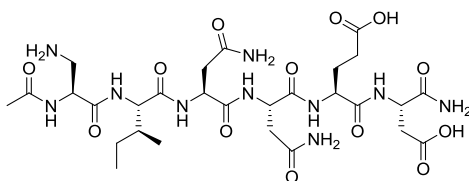
Tabla PE11 | Desplazamientos químicos (ppm) de ¹H y de ¹³C (cursiva) del péptido cíclico **1.19***

Residuo	NH	α-CH	β-CH	Otros
Gly1	8.38	4.59 (56.1)	3.19** (30.0)	Ac 2.00 (24.2) H-5 (triazol) 7.88 δ-CH ₃ 0.85 (13.0)
Ile2	8.44	4.27 (61.0)	1.83 (38.8)	γ-CH ₃ 0.91 (17.6) γ-CH ₂ 1.42, 1.17 (29.9)
Asn3	8.90	4.56 (55.2)	2.90** (38.4)	CONH ₂ 7.82, 7.04
Asn4	8.70	4.56 (54.8)	2.89** (38.2)	CONH ₂ 7.62, 6.99
Glu5	8.16	4.36 (56.3)	2.02, 1.79 (29.5)	γ-CH ₂ 2.19** (36.1)
Gly6	-	5.12 (-)	4.71** (-)	CONH ₂ terminal 7.75, 7.42

*Los espectros de ¹H y ¹³C se han adquirido en disolución de D₂O:H₂O 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ¹³C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

4.5.3. Péptidos lineales y cíclicos con puentes amida

Ac-[Dap-Ile-Asn-Asn-Glu-Asp]-NH₂ (1.52)



La síntesis del péptido lineal **1.52** se lleva a cabo a partir de 0.09 mmol de resina HMBA de tipo amida Rink, según el protocolo general de elongación (apartado 4.4.2.3), usando DIC/HOBt como agente de acoplamiento (método A) y como aminoácidos de partida Fmoc-Asp(OAl)-OH, Fmoc-Glu(^tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH y Fmoc-Dap(Alloc)-OH,

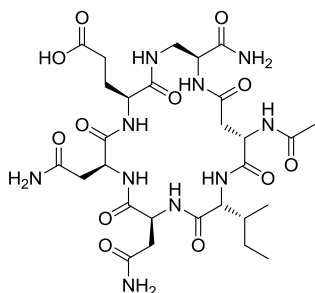
según correspondan. Posteriormente se lleva a cabo la acetilación del extremo N-terminal (apartado 4.4.2.4), la desprotección de las cadenas laterales (apartado 4.4.2.5) y el desanclaje del péptido de la resina según el protocolo general (apartado

4.4.2.6). El crudo final se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage (0% inicial de A hasta 100% final de A), obteniéndose tras purificar y liofilizar, 58 mg (90% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido **1.52**. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 2.57 min (>98% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para $C_{28}H_{46}N_{10}O_{13}$ 730.3240; encontrada $[M+H]^+$ 731.3350 (4.24 ppm). **1H -RMN** (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ 0.81 (m, 6H, δ -CH₃, γ -CH₃ Ile2), 1.03 (m, 1H, γ -CH₂ Ile2), 1.39 (m, 1H, γ -CH₃ Ile2), 1.76 (m, 2H, β -CH Ile2, β -CH₂ Glu5), 1.90 (m, 4H, β -CH₂ Ac, Glu5), 2.25 (m, 2H, γ -CH₂ Glu5), 2.71 (dd aparente, 1H, β -CH₂ Asp6, J = 16.5, 8.0 Hz), 2.94 (m, 1H, β -CH₂ Dap1), 3.16 (m, 1H, β -CH₂ Dap1), 4.08 (m, 1H, α -CH Glu5), 4.16 (t, 1H, α -CH Ile2, J = 7.6 Hz), 4.41-4.63 (m, 4H, α -CH Asp6, α -CH Asn3, α -CH Asn4, α -CH Dap1), 6.93 (m, 2H, CONH₂), 7.00 (m, 1H, CONH₂), 7.13 (m, 1H, CONH₂), 7.44 (s, 1H, HN), 7.50 (s, 1H, HN), 7.94 (d, 1H, HN Ile2, J = 8.0 Hz), 8.08 (t aparente, 2H, HN Asn3, HN Asn4, J = 8.5 Hz), 8.27 (m, 3H, HN Dap1, HN Glu5, HN Asp6).

4.5.3.1. Síntesis de los péptidos cíclicos **1.20** y **1.21** mediante macrolactamización.

Procedimiento general: la síntesis de los péptidos cíclicos con puente amida se realiza a partir de los correspondientes análogos lineales acetilados **1.50** y **1.51** anclados a la resina, que incorporan residuos de Asp y Dap, previa desprotección de las cadenas laterales de estos residuos (apartado 4.4.2.5). La peptidil-resina correspondiente (1 eq.), previamente hinchada, se trata con una disolución de HATU (10 eq.), HOBT (10 eq.), y DIEA (20 eq.) en DCM seco (3 volúmenes respecto a la resina). La mezcla se agita a temperatura ambiente sobre agitador orbitálico toda la noche. Una vez comprobado que el ensayo de Kaiser es negativo, se procede al lavado de la resina y posterior desanclaje en condiciones acidolíticas (apartado 4.4.2.6). La mezcla de desanclaje se concentra a presión reducida, el crudo resultante se disuelve en H₂O (5 mL), y se lava con Et₂O (4 x 5 mL) y AcOEt (3 x 5 mL). Por último, la fase acuosa se liofiliza y se purifica el crudo final mediante cromatografía de fase reversa.

Ac-ciclo(CH₂-CO-NH-CH₂)^{1,6}-[Gly-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly]-NH₂ (**1.20**)



A partir del péptido lineal acetilado anclado a la resina **1.50** (0.07 mmol) se lleva a cabo la ciclación siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. El crudo final (127 mg) se purifica con un cartucho de fase reversa Discovery DSC-18 en un *manifold* (gradiente manual, 0% inicial de A hasta 90% final de A) obteniéndose 17 mg (34% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso tras liofilizar, que se identifica como el péptido **1.20**. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R : 2.87 min (> 98% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para $C_{28}H_{44}N_{10}O_{12}$ 712.3140; encontrada

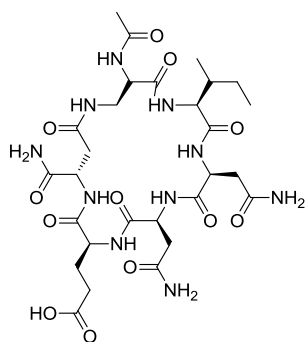
$[M+H]^+$ 713.3199 (-1.87 ppm).

Tabla PE12 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del péptido cíclico **1.20***.

Residuo	NH	α -CH	β -CH	Otros
Gly1	8.48	4.68 (52.9)	2.72, 2.83 (39.6)	Ac 2.00 (24.3) δ -CH ₃ 0.88 (13.2)
Ile2	8.62	4.25 (61.7)	1.91 (38.9)	γ -CH ₃ 0.92 (17.6) γ -CH ₂ 1.20, 1.43 (27.1)
Asn3	8.62	4.67 (53.4)	2.90, 2.97 (38.4)	CONH ₂ 7.04, 7.81
Asn4	8.55	4.60 (54.5)	2.81, 2.91 (38.5)	CONH ₂ 7.01, 7.71
Glu5	8.33	4.30 (57.0)	1.98, 2.07 (27.9)	γ -CH ₂ 2.26, 2.27 (36.2) γ -NH ₂ 8.27
Gly6	8.35	4.57 (56.1)	3.41, 3.73 (43.2)	CONH ₂ terminal 7.30, 7.62

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en disolución de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm.

Ac-ciclo(CH₂-NH-CO-CH₂)^{1,6}-[Gly-Ile-Asn-Asn-Glu-Gly]-NH₂ (1.21)



A partir del péptido lineal acetilado anclado a la resina **1.51** (0.04 mmol) se lleva a cabo la ciclación siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. El crudo final (47 mg) se purifica mediante HPLC semipreparativo (3% inicial de A hasta 30% de A final en 27 min, t_R =10.95 min), obteniéndose, tras liofilizar, 9 mg (36% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido **1.21**. **HPLC analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R : 2.75 min (> 98% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$ 712.3140; encontrada $[\text{M}+\text{H}]^+$ 713.3234 (2.81 ppm).

Tabla PE13 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del péptido cíclico **1.21***.

Residuo	NH	α -CH	β -CH	Otros
Gly1	8.47	4.40 (55.3)	3.52, 3.58 (43.1)	Ac 2.01 (24.3) N_H_2 8.06
Ile2	8.46	4.38 (61.0)	1.91 (39.4)	δ -CH ₃ 0.86 (13.5) γ -CH ₃ 0.90 (17.8) γ -CH ₂ 1.12, 1.33 (26.6)
Asn3	8.91	4.54 (54.4)	2.81, 2.91 (38.2)	CONH ₂ 7.09, 7.87
Asn4	8.67	4.69 (54.4)	2.82, 2.93 (38.3)	CONH ₂ 7.03, 7.75
Glu5	8.47	4.20 (57.7)	1.99, 2.08 (29.8)	γ -CH ₂ 2.31, 2.27 (36.5)
Gly6	8.21	4.79 (53.0)	2.69, 2.82 (39.7)	CONH ₂ terminal: 7.28, 7.42

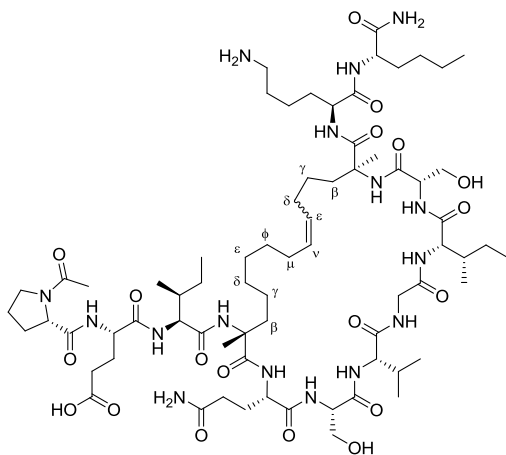
*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en disolución de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm.

4.6. Síntesis y caracterización de inhibidores de la dimerización de la Li-TryR

4.6.1. Síntesis de los péptidos grapados insaturados **2.06** y **2.07** mediante reacción de metátesis.

Procedimiento general: la síntesis de los péptidos lineales anclados a la resina en su forma Fmoc **2.10** y **2.11** se lleva a cabo a partir de 0.05 mmol de resina HMBA de tipo amida Rink, según el protocolo general de elongación (apartado 4.4.2.3), usando HCTU/DIEA como agente de acoplamiento (método C) y como aminoácidos de partida Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-(S)-Ala(4'-pentenil)-OH ((S)-**2.02**), Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-(R)-Ala(7'-octenil)-OH ((R)-**2.05**), Fmoc-Glu(^tBu)-OH y Fmoc-Pro-OH, según correspondan. En todos los casos, los acoplamientos se llevaron a cabo en un reactor de microondas. Posteriormente, se lleva a cabo la reacción de RCM entre 30 y 150 min, a partir de los análogos lineales anclados a la resina **2.10** y **2.11** (0.05-0.07 mmol) que incorporan los residuos no naturales (S)-**2.02** y (R)-**2.05** en las posiciones de ciclación, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.5.1.2 durante 30 – 150 min. Finalmente, se elimina el grupo Fmoc del extremo N-terminal, se acetila (apartado 4.4.2.4) y se desancla el péptido del soporte polimérico según el protocolo general (apartado 4.4.2.6). El crudo obtenido tras sedimentar la mezcla de desanclaje en centrífuga, se liofiliza y se purifica en un cartucho de fase reversa en un *manifold* (gradiente manual, 0% inicial de A hasta 100% final de A). Los péptidos que contienen un residuo básico (p.e., Lys) se obtienen como su correspondiente sal de trifluoroacetato.

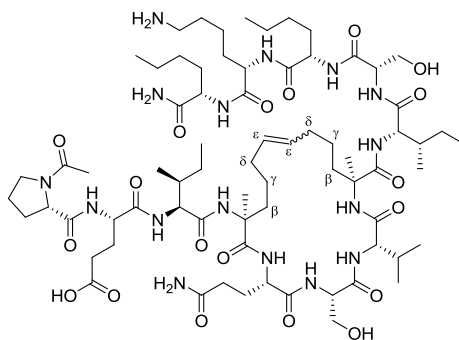
Ac-Pro-Glu-Ile-ciclo[(CH₂)₆CH=CH(CH₂)₃]^{4,11} [(D)-Ala-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Ala]-Lys-Nle-NH₂ (**2.06**)



A partir de 0.05 mmol de soporte polimérico, se sintetiza el péptido anclado a la resina **2.10** en su forma Fmoc según el protocolo descrito. Se lleva a cabo entonces la ciclación mediante RCM durante 30 minutos. Tras el desanclaje, el compuesto **2.06** se obtuvo como mezcla de isómeros E/Z que pudieron ser parcialmente separados en cartucho de fase reversa, obteniéndose, tras liofilizar, 12.0 mg del isómero mayoritario **2.06a**, 1.0 mg del isómero minoritario **2.06b**, y 10.7 mg de una fracción una fracción mezcla (30% rendimiento global), todos ellos como sólidos blancos algodonoso. **HPLC analítico** (Waters, gradiente 1): t_R =

4.06 min. (**2.06a**), 3.89 min (**2.06b**) (> 98% pureza en ambos isómeros). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para C₇₁H₁₂₂N₁₆O₁₉ 1502.9072; encontrada [M+H]⁺ 1504.9109 (2.03 ppm). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) y ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): Tabla PE14.

Ac-Pro-Glu-Ile-ciclo[(CH₂)₄CH=CH(CH₂)₄]^{4,8}[(D)-Ala-Gln-Ser-Val-Ala]-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (2.07**)**

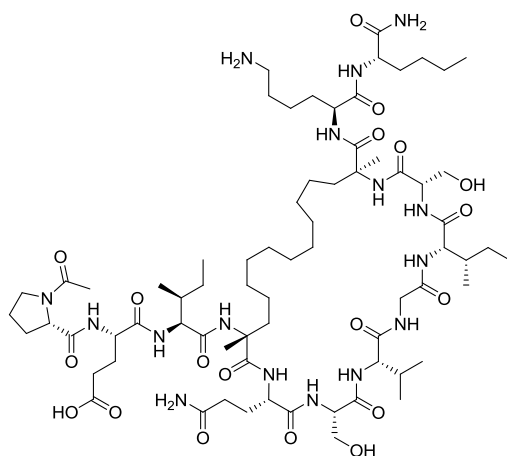


Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.04 mmol se soporte polimérico, se sintetiza el péptido en forma Fmoc lineal anclado a la resina **2.11** con la secuencia de aminoácidos correspondiente. Posteriormente, se lleva a cabo la ciclación mediante RCM calentando en microondas 150 minutos. Tras eliminación del grupo Fmoc, acetilación y desanclaje de la resina, el crudo de reacción (70 mg), se purifica en fase reversa en un HPLC-semipreparativo, obteniéndose 7.76 mg un sólido blanco algodonoso que se identifica como **2.07**

(6.4% rendimiento global) de una mezcla de isómeros E/Z que no puede separarse por cromatografía, (proporción de 58:42 en ¹H-RMN). **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): *t_R* = 9.01 min. (mayoritario, **2.07b**), 9.22 min. (minoritario, **2.07a**) (>98% pureza). **HRMS** (ESI positivo) *m/z*: Calculada para C₇₂H₁₂₄N₁₆O₁₉ 1516.9229; encontrada [M+2H]²⁺ 759.4669 (-1.37 ppm). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) y **¹³C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*₆): Tabla PE15.

4.6.2. Síntesis de los péptidos grapados saturados **2.08 y **2.09** mediante hidrogenación catalítica en disolución.**

Ac-Pro-Glu-Ile-ciclo(CH₂)₁₁^{4,11}[(D)-Ala-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Ala]-Lys-Nle-NH₂ (2.08**)**



Sobre una disolución de la mezcla E/Z del dicarba análogo **2.06a,b** (8.68 mg, 0.006 mmol) en THF:H₂O, 1:1 (6 mL), se añade en frío HCl concentrado (1.5 eq.) y Pd/C al 10% (5 mg). La mezcla de reacción se agita bajo atmósfera de H₂ (1 atm) durante 24 h. Posteriormente, se filtra sobre celita y se concentra para dar un precipitado blanco. El crudo de reacción se purifica en un *manifold* (gradiente manual, 0% inicial de A hasta 100% final de A), obteniéndose, tras liofilizar, 4.5 mg (52%) de un sólido blanco algodonoso que se identifica como el péptido saturado **2.08**. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 1): *t_R* =

7.54 min (90% pureza). **HRMS** (ESI positivo) *m/z*: Calculada para C₇₁H₁₂₄N₁₆O₁₉ 1504.9229; encontrada [M+H]⁺ 1506.9558 (0.06 ppm).

Ac-Pro-Glu-Ile-ciclo(CH₂)₈^{4,8}[*ala*-Gln-Ser-Val-Gly]-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (2.09)

Sobre una disolución de la mezcla E/Z del péptido insaturado **2.07** (15.6 mg, 0.005 mmol) en una mezcla de THF:H₂O, 1:1 (4 mL) y HCl concentrado (0.98 mL), se añade en frío Pd/C al 10% (5 mg). La mezcla de reacción se agita bajo atmósfera de H₂ (1 atm) durante 24 h. Posteriormente se filtra sobre celita y se concentra para dar un precipitado blanco. El precipitado se purifica en cartucho de fase reversa en un *manifold* (gradiente manual, 0% inicial de A hasta 100% final de A), obteniéndose, tras liofilizar, 2.24 mg (15%) de un sólido blanco algodonoso

que se identifica como el péptido saturado **2.09**. **HPLC analítico** (Waters, gradiente 1): t_R = 1.86 min (82% pureza). **HRMS** (ESI positivo) m/z : Calculada para C₇₂H₁₂₆O₁₉N₁₆ 1518.9424; encontrada [M+H]⁺ 1519.9502 (2.55 ppm).

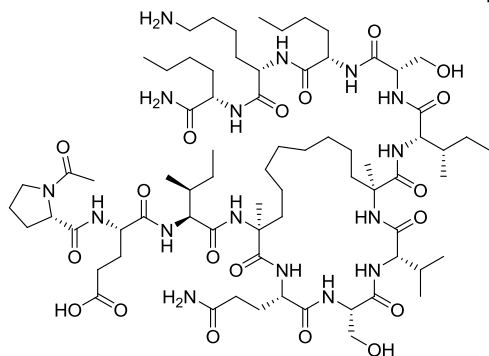


Tabla PE14 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del isómero mayoritario del péptido cíclico **2.06a***.

Residuo	NH	α -CH	β -CH	Otros
Pro1	-	4.25 (65.7)	2.00, 2.33 (33.2)	Ac 2.20 (25.1) γ -CH ₂ 2.01, 2.13 (28.3) δ -CH ₂ 3.64, 3.87 (52.2)
Glu2	9.32	4.13 (60.4)	2.06** (29.7)	2.37** (37.4)
Ile3	7.70	3.82 (65.5)	2.08 (33.2)	δ -CH ₃ 0.91 (13.1) γ -CH ₃ 0.93 (17.8) γ -CH ₂ 1.18, 1.59 (29.0) β -CH ₃ γ -CH ₂ 1.18, 1.72 (26.3) δ -CH ₂ 1.11, 1.40 (35.5)
(D)-Ala4	7.85	-	1.50, 2.31 (39.6)	ϵ -CH ₂ - ; ϕ -CH ₂ - μ -CH ₂ 1.98, 2.10 (36.3) ν -CH 5.35 (-)
Gln5	8.12	4.01 (60.4)	2.14** (30.2)	γ -CH ₂ 2.38, 2.48 (35.4) CONH ₂ 6.67, 7.09
Ser6	7.73	4.29 (63.0)	3.99, 4.10 (64.1)	
Val7	8.59	3.77 (67.0)	2.13 (32.9)	γ -CH ₃ 0.98, 1.05 (22.6, 22.9)
Gly8	8.60	3.85, 3.91 (48.2)		
Ile9	7.86	3.93 (65.4)	1.99 (39.2)	δ -CH ₃ 0.91 (13.9) γ -CH ₃ 0.97 (18.1) γ -CH ₂ 1.25, 1.76 (29.9)
Ser10	7.59	4.11 (65.6)	3.97** (64.1)	
Ala11	8.25	-	1.74, 1.98 (42.7)	β -CH ₃ - γ -CH ₂ 1.34** (-) δ -CH ₂ 1.87, 1.95 (35.5) ϵ -CH 5.43 (-)
Lys12	7.57	4.16 (59.0)	1.88** (33.8)	γ -CH ₂ 1.52, 1.62 (26.1) δ -CH ₂ 1.33 (30.1) ϵ -CH ₂ 3.00 (43.2) NH ₂ -
Nle13	7.99	4.17 (58.7)	1.88** (34.5)	γ -CH ₂ 1.51** (31.7) δ -CH ₂ 1.33** (25.4) ϵ -CH ₃ 0.88 (16.6) CONH ₂ terminal 6.92, 7.33

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en disolución de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Tabla PE15 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del isómero mayoritario del péptido cíclico **2.07a***.

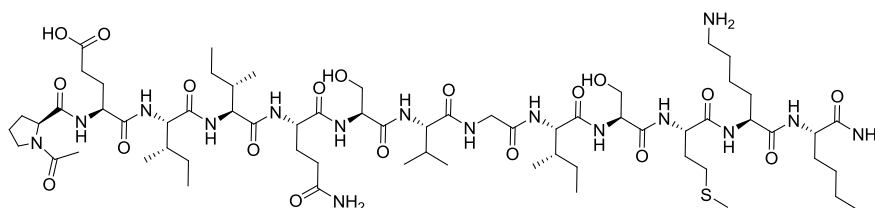
<i>Residuo</i>	<i>NH</i>	<i>α-CH</i>	<i>β-CH</i>	<i>Otros</i>
Pro1	-	4.28 (64.9)	2.16, 2.36 (31.8)	Ac 2.06 (24.0) γ -CH ₂ 1.99, 2.04 (-) δ -CH ₂ 3.63, 3.88 (57.8)
Glu2	9.00	4.12 (59.6)	1.99, 2.08 (32.5)	2.42, 2.49 (37.4)
Ile3	7.64	3.79 (64.6)	2.10 (37.7)	δ -CH ₃ 0.86 (-) γ -CH ₃ 0.94 (16.0) γ -CH ₂ 1.17, 1.60 (-) β -CH ₃ 1.52 (-)
Ala4	7.81	-	1.62, 1.76 (-)	γ -CH ₂ 1.42** (22.6) δ -CH ₂ 2.08, 2.17 (-) ϵ -CH 5.48 (-)
Gln5	8.50	4.07 (60.1)	2.20, 2.27 (-)	γ -CH ₂ 2.43, 2.60 (34.5) CONH ₂ 6.32, 6.49
Ser6	7.74	4.23 (62.2)	4.06** (-)	
Val7	7.75	3.64 (58.9)	2.37 (-)	γ -CH ₃ 0.96, 1.03 (20.0, 21.5)
Ala8	8.37	-	2.25** (37.9)	β -CH ₃ 1.49 (-) γ -CH ₂ 1.35, 1.61 (20.2) δ -CH ₂ 1.95, 2.32 (37.0) ϵ -CH 5.35 (-)
Ile9	8.45	3.75 (65.8)	1.94 (38.2)	δ -CH ₃ 0.90 (12.4) γ -CH ₃ 0.97 (16.8) γ -CH ₂ 1.23, 1.50 (30.8)
Ser10	7.84	4.20 (66.9)	4.03** (-)	
Nle11	8.45	4.20 (58.1)	1.88** (33.7)	γ -CH ₂ 1.51** (21.2) δ -CH ₂ 1.33** (24.2) ϵ -CH ₂ 0.89** (15.0) γ -CH ₂ 1.57** (24.4)
Lys12	8.17	4.24 (57.9)	2.01, 2.07 (-)	δ -CH ₂ 1.74** (28.4) ϵ -CH ₂ 3.01 (42.1) ω -NH ₂ 6.78, 7.19
Nle13	8.22	4.18 (59.6)	1.86, 1.97 (33.2)	γ -CH ₂ 1.35, 1.60 (31.7) δ -CH ₂ 1.30** (27.8) ϵ -CH ₃ 0.86** (15.0) CONH ₂ terminal 7.20, 7.84

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en disolución de $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:9 a pH 7.0 y 5 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

4.6.3. Síntesis de los análogos lineales 2.30 - 2.35

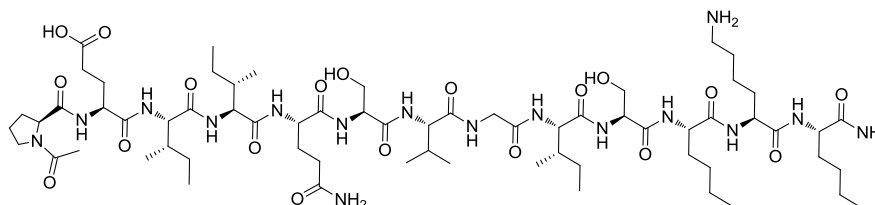
Procedimiento general: la síntesis de los correspondientes péptidos lineales anclados a la resina en su forma Fmoc, se lleva a cabo a partir de 0.05-0.14 mmol de resina HMBA de tipo amida *Rink*, según el protocolo general de elongación (apartado 4.4.2.3), usando HCTU/DIEA como agente de acoplamiento (método C) y como aminoácidos de partida Fmoc-Met-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(^tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH y Fmoc-Pro-OH, según correspondan. En todos los casos, los acoplamientos se llevaron a cabo en un reactor de microondas. A partir del sexto aminoácido anclado, se emplea como mezcla básica una disolución de DBU:piperidina:DMF, 1:1:48 en volumen para eliminar el grupo Fmoc (apartado 4.4.2.3). Por último, se elimina el grupo Fmoc del extremo N-terminal en las peptidil-resinas correspondientes, se acetila (apartado 4.4.2.4) y se desancla el péptido del soporte polimérico según el protocolo general, usando una mezcla de desanclaje distinta en función a la presencia o no de Met (apartado 4.4.2.6). El crudo obtenido, tras sedimentar la mezcla de desanclaje en centrifuga, se liofiliza y se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage (0% inicial de A hasta 100% final de A). Todos los péptidos se obtienen como su correspondiente sal de trifluoroacetato y como un sólido blanco algodonoso tras liofilizar.

Ac-Pro-Glu-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Met-Lys-Nle-NH₂ (2.30, Met13Nle)



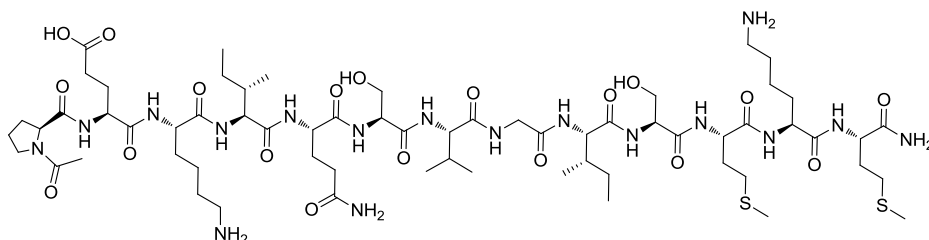
Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.11 mmol de resina, se obtienen 9.1 mg (6% de rendimiento global), que se identifican como el péptido **2.30**. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): $t_R = 6.74$ min (90% pureza). **HRMS** (ES modo positivo) m/z : Calculado para C₆₅H₁₁₄N₁₆O₁₉S₂ 1454.8167; encontrada [(M+2H/2)]⁺ 728.4160 (0.4 ppm). **¹H-RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆) y **¹³C-RMN** (125 MHz, DMSO-*d*₆): Tabla PE16.

Ac-Pro-Glu-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (2.31) (Met11Nle+Met13Nle)



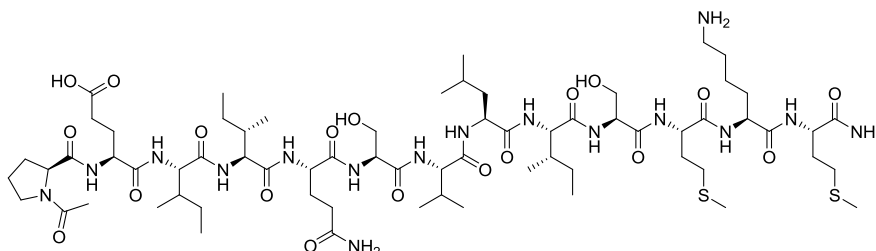
Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.14 mmol de resina, se obtienen 2.7 mg (2% de rendimiento global), que se identifican como el péptido **2.31**. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): $t_R = 6.99$ min (90% pureza). **HRMS** (ES modo positivo) m/z : Calculado para $C_{66}H_{116}N_{16}O_{19}$ 1436.8603; encontrada 1437.8623 (-3.51 ppm). 1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) y ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6): Tabla PE17.

Ac-Pro-Glu-Lys-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Met-Lys-Met-NH₂ (2.32, Ile3Lys)



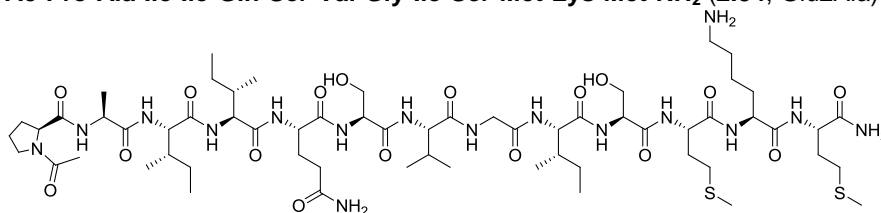
Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.05 mmol de resina, se obtienen 7.1 mg (8% de rendimiento global), que se identifican como el péptido **2.32**. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): $t_R = 5.10$ min (> 90% pureza). **HRMS** (ES modo positivo) m/z : Calculado para $C_{64}H_{113}N_{17}O_{19}S_2$ 1487.7840; encontrada 1488.7949 (-3.60 ppm). 1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) y ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6): Tabla PE18.

Ac-Pro-Glu-Lys-Ile-Gln-Ser-Val-Leu-Ile-Ser-Met-Lys-Met-NH₂ (2.33, Gly8Leu)



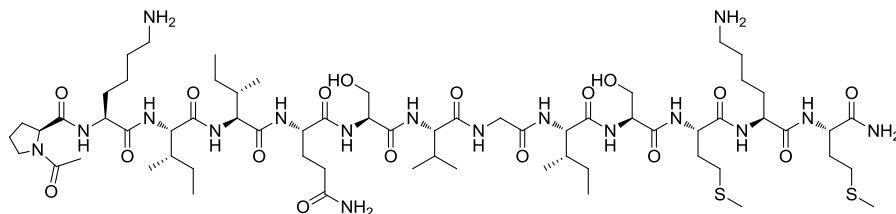
Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.09 mmol de resina, se obtienen 2.7 mg (8% de rendimiento global), que se identifican como el péptido **2.33**. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): $t_R = 8.28$ min (82% pureza). **HRMS** (ES modo positivo) m/z : Calculada para $C_{68}H_{120}N_{16}O_{19}S_2$ 1528.8357; encontrada $[(M+2H)/2]^+$ 765.4377 (12.5 ppm). 1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6): Tabla PE19.

Ac-Pro-Ala-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Met-Lys-Met-NH₂ (2.34, Glu2Ala)



Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.047 mmol de resina, se obtienen 9.1 mg (14% de rendimiento global), que se identifican como el péptido **2.34**. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 8.88 min (> 90% pureza). **HRMS** (ESI modo positivo) m/z : Calculado para C₆₂H₁₁₀N₁₆O₁₇S₂ 1414.7676; encontrada [M+H]⁺ 1415.7787 (3.8 ppm). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) y ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): Tabla PE20.

Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Met-Lys-Met-NH₂ (2.35, Glu2Lys)



Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.047 mmol de resina, se obtienen 14.5 mg (21% de rendimiento global), que se identifican como el péptido **2.35**. **HPLC Analítico** (Agilent, gradiente 2): t_R = 6.03 min (95% pureza). **HRMS** (ES modo positivo) m/z : Calculado para C₆₅H₁₁₇N₁₇O₁₇S₂ 1471.8255; encontrada [M+H]⁺ 1472.8341 (1.3 ppm). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) y ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆): Tabla PE21.

Tabla PE16 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del péptido lineal **2.30***.

Residuo	NH	α -CH	β -CH	Otros
Pro1		4.27 (59.1)	1.85** (-)	Ac 1.97 (22.1) γ -CH ₂ 2.02** (-) δ -CH ₂ 3.45, 3.54 (-)
Glu2	8.00	4.27 (54.8)	1.73, 2.02 (-)	γ -CH ₂ 1.84, 2.08 (31.3)
Ile3	7.96	4.16 (57.6)	1.69 (-)	δ -CH ₃ 0.80 (10.6) γ -CH ₃ 1.06 (-) γ -CH ₂ 1.41** (24.3)
Ile4	7.86	4.18 (56.5)	1.70 (36.1)	δ -CH ₃ 0.80 (-) γ -CH ₃ 1.06 (-) γ -CH ₂ 1.41** (-)
Gln5	8.24	4.33 (-)	1.75, 1.89 (31.9)	γ -CH ₂ 2.21** (30.1) CONH ₂ -
Ser6	8.12	4.29 (54.8)	3.58** (61.3)	HO- 5.01
Val7	7.81	4.25 (56.3)	1.68 (36.4)	γ -CH ₃ 0.81 (15.0)
Gly8	8.18	3.71, 3.76 (41.6)		
Ile9	7.63	4.16 (56.4)	1.71 (35.9)	δ -CH ₃ 0.80 () γ -CH ₃ 1.06 () γ -CH ₂ 1.25, 1.41 (24.0)
Ser10	7.90	4.36 (54.5)	3.52, 3.59 (61.3)	HO- 4.95
Met11	8.00	4.34 (51.7)	1.79, 1.92 (31.7)	γ -CH ₂ 2.44** (29.2) ϵ -CH ₂ -
Lys12	7.99	4.22 (52.1)	1.64** (40.5)	γ -CH ₂ 1.30** () δ -CH ₂ 1.51** () ϵ -CH ₂ 2.75** (38.5) ω -NH ₂ 7.55
Nle13	7.74	4.17 (57.7)	1.99** (30.3)	γ -CH ₂ 1.25** (21.9) δ -CH ₂ 1.50, 1.63 (-) ϵ -CH ₃ 0.85 (13.7) CONH ₂ terminal -

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en DMSO- d_6 a 25 °C en un equipo Varian 500 MHz.

**Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Tabla PE17 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del péptido lineal **2.31***.

Residuo	NH	$\alpha\text{-CH}$	$\beta\text{-CH}$	Otros
Pro1		4.27 (-)	1.85** (-)	Ac 1.97 (22.1) $\gamma\text{-CH}_2$ 2.02, 2.08 (31.1) $\delta\text{-CH}_2$ 3.46, 3.54 (47.5)
Glu2	8.02	4.24 (55.5)	1.72, 1.90 (-)	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.22** (-)
Ile3	7.86	4.14 (56.6)	1.70 (-)	$\delta\text{-CH}_3$ 0.80 (15.0) $\gamma\text{-CH}_3$ - (-)
Ile4	7.63	4.17 (51.7)	1.72 (-)	$\gamma\text{-CH}_2$ 1.06, 1.41 (24.2) $\delta\text{-CH}_3$ 0.79 (10.7) $\gamma\text{-CH}_3$ - (-)
Gln5	8.23	4.33 (-)	1.75, 1.88 (-)	$\gamma\text{-CH}_2$ 1.05, 1.41 (-)
Ser6	8.10	4.32 (54.5)	3.57** (61.2)	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.20** (29.9)
Val7	7.75	4.18 (56.9)	2.00 (34.8)	HO- 4.99
Gly8	8.19	3.71, 3.76 (41.6)		$\delta\text{-CH}_3$ 0.86** (18.9)
Ile9	7.80	4.26 (52.0)	1.68 ()	$\delta\text{-CH}_3$ 0.81 (-) $\gamma\text{-CH}_3$ - (-)
Ser10	7.89	4.36 (54.5)	3.51, 3.59 (-)	$\gamma\text{-CH}_2$ 1.06, 1.42 (24.0)
Nle11	7.90	4.21 (52.2)	1.65** (31.3)	HO- 4.95
Lys12	7.98	4.23 (52.0)	1.66** (-)	$\gamma\text{-CH}_2$ 1.51** (31.3) $\delta\text{-CH}_2$ 1.25** (21.8) $\epsilon\text{-CH}_2$ 0.84** (17.6) $\gamma\text{-CH}_2$ 1.50** (26.4)
Nle13	7.67	4.14 (51.8)	1.63** (-)	$\delta\text{-CH}_2$ 1.30** (-) $\epsilon\text{-CH}_2$ 2.75** (38.7) $\omega\text{-NH}_2$ 7.58
				$\gamma\text{-CH}_2$ 1.49** (31.4) $\delta\text{-CH}_2$ 1.24** (26.9) $\epsilon\text{-CH}_2$ 0.84** (13.6)

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en DMSO- d_6 a 25 °C en un equipo Varian 500 MHz.

**Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Tabla PE18 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del péptido lineal **2.32***.

Residuo	NH	α -CH	β -CH	Otros
Pro1		4.24 (58.7)	1.73, 2.09 (26.7)	Ac 2.00 (21.5) γ -CH ₂ 1.87, 2.06 (23.5) δ -CH ₂ 3.48, 3.58 (46.8)
Glu2	7.84	4.25 (50.9)	1.78, 1.92 (30.9)	γ -CH ₂ 1.88, 2.18 (28.6)
Lys3	7.99	4.19 (51.5)	2.18, 2.24 (37.9)	γ -CH ₃ 1.31** (24.0) δ -CH ₂ 1.51, 1.66 (28.6) ε -CH ₂ 3.32** (45.4)
Ile4	7.70	4.14 (56.0)	2.00 (35.8)	δ -CH ₃ 0.82 (-) γ -CH ₃ 1.06 (-) γ -CH ₂ 1.37, 1.68 (-)
Gln5	8.02	4.33 (51.1)	1.79, 2.10 (30.5)	γ -CH ₂ 1.92, 2.44 (26.1) CONH ₂ -
Ser6	8.12	4.30 (54.1)	3.58** (-)	HO- 5.03
Val7	7.75	4.19 (56.7)	2.00 (29.6)	γ -CH ₃ 0.85 (16.9, 18.2)
Gly8	8.20	3.72, 3.77 (41.1)		
Ile9	7.82	4.25 (55.7)	1.92 (-)	δ -CH ₃ 0.81 (14.3) γ -CH ₃ 1.06 (-) γ -CH ₂ 1.41, 1.68 (23.4)
Ser10	7.89	4.37 (54.0)	3.53, 3.59 (60.6)	HO- 4.95
Met11	7.89	4.37 (59.3)	1.75** (26.2)	γ -CH ₂ 2.18** (-) ε -CH ₂ - γ -CH ₂ 1.29** (-)
Lys12	7.80	4.29 (-)	2.23** (-)	δ -CH ₂ 1.61, 1.75 (-) ε -CH ₂ 3.39** (45.3) ω -NH ₂ - γ -CH ₂ 1.91, 2.23 (-)
Met13	8.26	4.28 (52.1)	1.77** (-)	δ -CH ₂ - (30.7) ε -CH ₃ - CONH ₂ terminal 7.91

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en DMSO- d_6 a 25 °C en un equipo Varian Unity 500 MHz. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Tabla PE19 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H del péptido lineal **2.33***.

Residuo	NH	$\alpha\text{-CH}$	$\beta\text{-CH}$	Otros
Pro1		4.24	1.87**	Ac 2.03 $\gamma\text{-CH}_2$ 2.07** $\delta\text{-CH}_2$ 3.50, 3.57
Glu2	8.10	4.20	1.77, 2.11	$\gamma\text{-CH}_2$ 1.92, 2.25
Ile3	-		1.73	$\delta\text{-CH}_3$ 0.81 $\gamma\text{-CH}_3$ 0.87 $\gamma\text{-CH}_2$ 1.07, 1.43**
Ile4	-	4.07	1.78	$\delta\text{-CH}_3$ 0.81 $\gamma\text{-CH}_3$ - $\gamma\text{-CH}_2$ 1.09, 1.44
Gln5	7.98	4.24	1.87, 1.93	$\gamma\text{-CH}_2$ 1.79, 2.44 CONH ₂ -
Ser6	7.87	4.27	3.55, 3.59	HO- 5.01
Val7	-	4.28	1.99	$\gamma\text{-CH}_3$ 0.85, 1.24
Leu8	7.93	4.27	1.66	$\gamma\text{-CH}_2$ 1.32, 1.54
Ile9	-	4.03	1.75	$\delta\text{-CH}_3$ 0.80 $\gamma\text{-CH}_3$ - $\gamma\text{-CH}_2$ 1.08, 1.45**
Ser10	7.91	4.20	3.59, 3.64	HO- 4.97
Met11	7.80	4.25	1.78, 1.92	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.40, 2.46
Lys12	-	4.08	1.68, 1.78	$\gamma\text{-CH}_2$ 1.32** $\delta\text{-CH}_2$ 1.51** $\varepsilon\text{-CH}_2$ 2.75** $\omega\text{-NH}_2$ 7.61
Met13	7.72	4.23	1.83, 1.93	$\gamma\text{-CH}_2$ 2.41, 2.48 CONH ₂ terminal -

*Los espectros de ^1H se han adquirido en DMSO- d_6 a 25 °C. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Tabla PE20 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del péptido lineal **2.34***.

Residuo	NH	α -CH	β -CH	Otros
Pro1		4.26 (58.9)	1.73, 2.08 (31.4)	Ac 2.03 (24.0) γ -CH ₂ 1.84, 2.04 (-) δ -CH ₂ 3.45, 3.54 (47.3)
Ala2	8.24	4.36 (48.0)	1.19 (17.5)	
Ile3	7.82	4.25 (56.3)	1.70 (36.3)	δ -CH ₃ 0.81 (-) γ -CH ₃ 1.06 (16.0) γ -CH ₂ 1.41** (-)
Ile4	7.77	-	1.72 (-)	δ -CH ₃ 0.80 (-) γ -CH ₃ 1.07 (16.0) γ -CH ₂ - (-)
Gln5	8.01	4.33 (51.8)	1.92** (31.5)	γ -CH ₂ 1.79, 2.44 (31.5) CONH ₂ -
Ser6	8.11	4.30 (54.8)	3.58** (-)	HO- 5.02
Val7	7.75	4.17 (57.0)	1.99 (-)	γ -CH ₃ 0.85, 1.24 (18.2, 18.8)
Gly8	8.18	3.71, 3.77 (41.6)		
Ile9	7.63	- (-)	1.73 (-)	δ -CH ₃ 0.80 (10.8) γ -CH ₃ 1.06 (24.0) γ -CH ₂ 1.41** (-)
Ser10	7.90	4.36 (54.5)	3.52, 3.59 (61.3)	HO- 4.95
Met11	7.84	4.26 (51.7)	1.79, 1.82 (-)	γ -CH ₂ 2.45** (-) ε -CH ₂ - γ -CH ₂ 1.31** (22.0)
Lys12	8.17	4.20 (52.2)	2.01, 2.07 (38.5)	δ -CH ₂ 1.51, 1.66 (26.3) ε -CH ₂ 2.75** (38.5) ω -NH ₂ 7.61
Met13	8.22	4.36 (59.8)	1.90, 2.16 (-)	γ -CH ₂ 2.39, 2.44 (46.0) ε -CH ₃ - CONH ₂ terminal -

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en DMSO- d_6 a 25 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

Tabla PE21 | Desplazamientos químicos (ppm) de ^1H y de ^{13}C (cursiva) del péptido lineal **2.35***.

<i>Residuo</i>	<i>NH</i>	<i>α-CH</i>	<i>β-CH</i>	<i>Otros</i>
Pro1		4.37 (60.0)	1.75** (27.8)	Ac 2.06 (22.8) γ -CH ₂ 1.88, 2.18 (24.0) δ -CH ₂ 3.33, 3.42 (46.0) γ -CH ₂ 1.88, 2.18 (22.0) δ -CH ₂ 1.50, 1.67 (26.3) ϵ -CH ₂ 3.52, 3.58 (47.4) ω -NH ₂ 7.61 δ -CH ₃ 0.82 (15.0)
Lys2	7.99	4.20 (52.2)	2.75** (38.5)	γ -CH ₃ - (-) γ -CH ₂ 1.06, 1.41 (26.3) δ -CH ₃ 0.80 (-) γ -CH ₃ - (-) γ -CH ₂ 1.06, 1.41 (24.0) γ -CH ₂ 1.78, 1.92 (-) CONH ₂ -
Ile3	8.05	4.25 (56.3)	1.68 (32.5)	HO- 5.02
Ile4	7.65	4.17 (-)	1.72 (36.2)	γ -CH ₃ 0.85 (17.5, 18.9)
Gln5	7.85	4.16 (-)	2.39, 2.44 (-)	
Ser6	8.12	4.30 (54.9)	3.58** (61.4)	
Val7	7.77	4.18 (56.8)	1.99 (30.3)	
Gly8	8.18	3.70, 3.80 (41.6)		
Ile9	7.85	4.16 (-)	1.71 (-)	δ -CH ₃ 0.80 (10.8) γ -CH ₃ 0.92 (-) γ -CH ₂ 1.41 (24.0)
Ser10	8.02	4.33 (54.5)	3.52, 3.59 (61.3)	HO- 4.97
Met11	8.00	4.33 (51.8)	1.79, 1.82 (31.5)	γ -CH ₂ 2.45** (29.2) ϵ -CH ₂ - γ -CH ₂ 1.80** (29.5) δ -CH ₂ 1.81, 1.85 (27.7) ϵ -CH ₂ 3.47, 3.53 (38.5) ω -NH ₂ - γ -CH ₂ 2.39, 2.44 (-) δ -CH ₂ 1.67** (30.7) ϵ -CH ₃ - CONH ₂ terminal -
Lys12	8.03	4.27 (58.8)	2.06** (29.3)	
Met13	7.83	4.26 (51.7)	1.79, 1.92 (-)	

*Los espectros de ^1H y ^{13}C se han adquirido en DMSO- d_6 a 25 °C. La adquisición de ^{13}C se ha realizado hasta 65 ppm. **Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

4.7. Métodos para la determinación estructural

4.7.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).

4.7.1.1. Adquisición de las muestras

Las muestras para los experimentos de RMN fueron preparadas en disolución acuosa en mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1, en volumen). En aquellos casos en los que los péptidos fueron insolubles en la mezcla acuosa, se añadió un 30% de TFE. En todos los casos, la concentración utilizada fue de 1-2 mM y el pH fue ajustado a 7.0 por adición de cantidades mínimas de NaOD o DCl. Los valores de pH (7.0) se midieron con un microelectrodo de vidrio y no se corrigieron de efectos isotópicos. La temperatura de la criosonda de RMN se calibró utilizando una muestra de metanol. Los desplazamientos químicos de ^1H se calibraron utilizando como referencia interna la sal sódica del ácido el 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato (DSS) a cuya señal se le asignó un valor de 0.00 ppm.

Los espectros monodimensionales (1D) se registraron utilizando 32K palabras (1 palabra = 4 bytes) y se rellenaron de ceros hasta 64K antes de llevar a cabo la transformación de Fourier. La espectros bidimensionales homonucleares (COSY, TOCSY y NOESY) se adquirieron mediante técnicas estándar utilizando presaturación de la señal del agua en modo sensible a la fase mediante el método TPPI (*Time-Proportional Phase Incrementation*)¹³. Los espectros TOCSY se registraron utilizando una potencia de bloqueo de espín de 10dB (secuencia MLEV17) y un tiempo de mezcla de 60 ms. Los tiempos de mezcla en los espectros NOESY fueron 200 ms. Los experimentos HSQC ^1H - ^{13}C y de HSQC ^1H - ^{15}N se adquirieron en abundancia natural de ^{13}C y de ^{15}N , respectivamente, en muestras a una concentración de 1-2 mM preparadas en $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$. Las matrices de adquisición de datos de los espectros 2D, generalmente, fueron definidas por 2048 x 512 puntos en t_2 y t_1 , respectivamente. Los espectros se procesaron utilizando el programa XWIN-NMR de Bruker. Las matrices de datos 2D se multiplicaron por una función ventana de seno al cuadrado o seno con el desplazamiento en fase optimizado para cada experimento y se rellenaron de ceros hasta formar matrices de 2K x 1K o de 4K x 2K antes de la transformada de Fourier. Tras el procesado de los espectros, se realizó una corrección de línea base en ambas dimensiones mediante funciones polinómicas. El δ de ^{13}C correspondiente a 0 ppm se obtuvo indirectamente multiplicando la frecuencia del espectrómetro correspondiente a 0 ppm en el espectro de ^1H , asignada al DSS por 0.25144954216.

4.7.1.2. Asignación de RMN

Las señales de ^1H RMN de los péptidos en solución acuosa se asignaron mediante métodos estándar de asignación secuencial¹⁴ haciendo uso del *software* SPARKY¹⁵ (T. D. Goddard y D. G. Kneller, Universidad de California, EE UU). Los desplazamientos químicos de ^{13}C se asignaron a partir de las señales de correlación entre un protón dado y el carbono unido covalentemente a él observadas en los espectros ^1H - ^{13}C HSQC.

4.7.1.3. Cálculo de estructura mediante el programa CYANA¹⁶.

Los cálculos de estructura se llevaron a cabo haciendo uso del programa CYANA¹⁶ introduciendo restricciones empíricas de distancia y ángulos diedros, para un sistema dado. Las restricciones de distancia, se obtuvieron a partir de la integración de los picos de correlación NOE y/o ROE no secuenciales observados en los espectros de RMN mediante el empleo de la sub-rutina de integración del programa SPARKY¹⁷ y calibrados y convertidos a máximos de restricciones de distancia con el programa CYANA. Por otro lado, las restricciones de ángulos diedros (ϕ , ψ) se obtuvieron mediante cálculo en el servidor en línea del programa TALOS+¹⁸ a partir de los desplazamientos químicos experimentales para $^1\text{H}\alpha$, $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$ y ^{15}N amídicos. Este programa es un método híbrido de predicción de estructura en proteínas a partir de datos empíricos de RMN. La estructura inicial en TALOS+ empleada es una conformación generada con ángulos de torsión ϕ y ψ al azar, lo que facilita la exploración adecuada del espacio conformacional aún siendo costoso en tiempo computacional. El ángulo ϕ para aquellos residuos que presentan restricciones angulares ambiguas fue restringido al rango -180° a 0° , excepto para los residuos de Asn y Gly.

Las diez mejores estructuras fueron visualizadas, superpuestas y analizadas usando los programas MOLMOL¹⁹ y PyMOL²⁰. En el caso de estar presentes residuos no naturales, para el cálculo de estructura y análisis posterior, se definieron como un residuo natural de estructura análoga (p.e., Lys o Cys). Todos los péptidos estudiados, se compararon con el fragmento de la proteína nativa al que mimetiza: el asa $\beta 7/\beta 8$ de la TI del VIH-1 (1dlo.pdb) y la hélice α Pro435-Met448 de la TryR de *L. infantum* (2jk6.pdb).

4.7.2. Dicroísmo circular

Adquisición de los espectros

Los espectros de dicroísmo circular se adquirieron en disolución acuosa con un 30% de TFE. Las concentraciones de las muestras fueron determinadas mediante la medida de Abs a 210 nm de las muestras evaluadas en CD. Se llevaron a cabo medidas entre 200 y 250 nm, a 4°C y usando un paso óptico de 1 mm en cubeta de cuarzo. El programa de adquisición de datos empleado fue el *Spectrum Measurement* (Jasco, Easton, MD, USA). Los experimentos se llevaron a cabo a una velocidad de barrido de $50\text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, un tiempo de respuesta de 2 s y 1 nm de ancho de anchura de banda. Los espectros obtenidos son el promedio de 4 barridos, en los que se corrigió la línea base con un blanco.

Tratamiento de datos y cálculo de helicidad experimental y teórica

El grado de helicidad experimental calculado en porcentaje, se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Baldwin y colaboradores²¹. Además, de modo comparativo, se empleó el servicio en línea AGADIR²² del grupo del Dr. Serrano para el cálculo de helicidad teórica en péptidos.

4.8. Métodos de simulación de dinámica molecular.

Todos los cálculos los realicé en el laboratorio del Prof. Federico Gago (Universidad de Alcalá), utilizando el clúster de cálculo Medusa (Universidad de Alcalá), Trueno (CSIC) y el supercomputador Marenostrum (Centro Nacional de Supercomputación - BSC).

4.8.1. Preparación de los sistemas teóricos

Los distintos sistemas teóricos fueron preparados usando la herramienta *tLeAP* de AMBER 11.0²³. Para construir el monómero de la TryR, se partió de la estructura cristalina de la enzima en su forma reducida determinada por difracción de rayos X (código 2JK6)²⁴ depositada en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB)²⁵. En los distintos sistemas inhibidor – monómero de la TryR, los péptidos proceden de la segunda subunidad de la enzima y las mutaciones necesarias se realizaron con *tLeAP*.

Los péptidos se situaron en una caja rectangular de 2090 aguas TIP3P²⁶ con una separación de 10 Å a los lados de la caja y no fue necesario neutralizar con átomos de sodio. El monómero y los distintos sistemas péptido – monómero se situaron en una caja de 200000 moléculas de agua TIP3P de media, y con un distancia de 15 Å a los lados de la caja. Además, para neutralizar las cargas se añadieron 11 iones de Na⁺.

4.8.2. Definición de residuos no naturales y cofactores

Para los aminoácidos no naturales presentes en los péptidos simulados: Nle, **2.02** y **2.05**, así como para el cofactor FAD en su forma reducida, se construyeron los archivos PREP. Este tipo de archivos son necesarios para que el programa AMBER reconozca a grupos prostéticos y moléculas orgánicas, no presentes en sus librerías. Así, en primer lugar se calcularon las distribuciones de cargas de estos residuos (cargas RESP), ajustando el potencial electrostático molecular calculado cuánticamente (RHF 6-31 G*/3-21G*) a un modelo de carga puntual usando la metodología RESP²⁷ en Gaussian²⁸. Por último, se editaron los archivos PREP manualmente, introduciendo en ellos las cargas anteriormente calculadas. Los archivos *frmod* para el cofactor FAD y los átomos de C_{sp} (llamados EC), fueron obtenidos de la base de parámetros de AMBER de Bryce y colaboradores²⁹ y suministrado por la Dra. Claire Coderch (Universidad de Alcalá).

4.8.3. Simulaciones de dinámica molecular

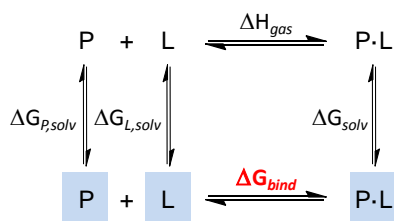
Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo empleando el módulo *sander* de la suite de programas AMBER10³⁰, usando el campo de fuerzas ff99SB³¹. Se aplicaron condiciones de límite periódico y las interacciones electrostáticas se trataron usando el método PME (*Particle Mesh Ewald*) con un espaciado de red de 1 Å. La distancia de *cutoff* para las interacciones no enlazantes fue de 10 y 15 Å para los péptidos y para los complejos péptido-proteína, respectivamente. Se aplicó el algoritmo SHAKE a todos los enlaces que comprometen hidrógenos en un tiempo de integración de 2.0 fs. Así, primero las moléculas de disolvente y los contra-iones fueron sometidos previamente a una minimización energética y se redistribuyeron alrededor del soluto restringido posicionalmente (25 Kcal·mol⁻¹·Å⁻²) durante 50 ps de dinámica molecular a temperatura y presión

constantes (300 K y 1 atm, respectivamente). A continuación, estas restricciones armónicas iniciales fueron gradualmente reducidas hasta su total eliminación en series de minimizaciones energéticas progresivas. Los sistemas resultantes fueron calentados de nuevo desde 100 a 300 K durante 20 ps y equilibrados en cinco ciclos durante 1 ns de dinámica molecular. Finalmente se llevaron a cabo simulaciones de 20, 40 o 50 ns a temperatura (300 K) y presión (1 atm) constantes, donde los sistemas de coordenadas fueron grabados cada 2 ps para un posterior análisis.

4.8.4. Cálculo de energías libres de interacción proteína – ligando

La energía libre de interacción (ΔG_{bind} , Kcal·mol⁻¹) de los péptidos con el monómero de la TryR se calculó empleando el método MM-GBSA (*molecular mechanisc/Generalized Born surface area*)³², con el módulo GB³³ implementado en AmberTools12 (MMPBSA.py, sin utilizar *sander*), mientras que la componente no polar fue estimada a partir del área superficial accesible al disolvente SASA. Cada término energético fue promediado cada 2 ps de simulación, entre los 10 y 18 ns de las distintas simulaciones de DM (400 fotogramas en total). La descomposición de la energía de interacción por residuo, se llevó a cabo con el módulo GB de *sander* de AMBER10, considerando el mismo intervalo de simulación de DM descrito antes (10-18 ns).

Para la interacción entre una proteína (P) y un ligando (L) en disolución y en un proceso en equilibrio dinámico de segundo orden (ver figura), en MM-GBSA se puede definir la energía libre de interacción (ΔG_{bind}) como la suma entre la entalpía de interacción en fase gas de proteína y ligando (ΔH_{gas}) y la energía de solvatación del sistema P·L (ΔG_{solv})³⁵:



$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - (G_P + G_L) = \Delta H_{gas} + \Delta G_{solv} =$$

$$= \Delta H_{gas,vdW} + \Delta H_{gas,elec} + \Delta G_{solv,np} + \Delta G_{solv,elec} - T\Delta S$$

[4.2]

Figura. Definición de la energía libre de interacción (ΔG_{bind} , rojo) entre proteína (P) y ligando (L) en MM-GBSA³⁵. En azul se indica el disolvente.

La ΔH_{gas} se puede considerar a su vez como una suma de los términos correspondientes a las interacciones en fase gas entre los componentes del complejo P·L: de naturaleza de van der Waals ($\Delta H_{gas,vdW}$) y electrostática ($\Delta H_{gas,elec}$), y la variación de energía interna (ΔH_{inter}) entre el complejo y los componentes (P,L) por separado (Ecuación 4.3). Este último componente está relacionado con las energías de enlace, ángulos y ángulos torsionales y en la mayoría de los casos tiende a cero.

$$\Delta H_{gas} = \Delta H_{gas,vdW} + \Delta H_{gas,elec} + \Delta H_{inter} \quad [4.3]$$

La ΔG_{solv} es la diferencia entre la energía de solvatación del complejo y la suma de las energías de solvatación de la proteína y ligando cuando se encuentran alejados el uno del otro. Se puede dividir en dos componentes (Ecuación 4.4): uno electrostático ($\Delta G_{solv,elec}$) y uno no polar ($\Delta G_{solv,np}$), y además, en un componente entrópico (ΔS)

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{solv,elec} + \Delta G_{solv,np} - T\Delta S \quad [4.4]$$

En MM-GBSA, la $\Delta G_{solv,elec}$ se calcula mediante el método generalizado de Born³⁶. Por otro lado, el término $\Delta G_{solv,np}$ se considera linealmente proporcional al área superficial accesible al disolvente (SASA) (Ecuación 4.5).

$$\Delta G_{solv,np} = \gamma SASA + b \quad [4.5]$$

El término entrópico ΔS , que se definiría como el coste energético en la pérdida de grados de libertad al pasar de los estados libres de ligando y proteína a su asociación como complejo.

Finalmente, la variación de energía libre de interacción (ΔG_{bind}) se puede desglosar en los términos que figuran en la Ecuación 4.6:

$$\Delta G_{bind} = \Delta H_{gas,vdW} + \Delta H_{gas,elec} + \Delta G_{solv,np} + \Delta G_{solv,elec} - T\Delta S \quad [4.6]$$

En nuestro caso, la variación de entropía no ha sido calculada.

4.8.5. *Análisis y visualización de los datos de las simulaciones de DM.*

El cálculo de los distintos parámetros geométricos analizados en las simulaciones de DM: distancias interatómicas (Å), ángulos de giro (Å), ángulos dihedros (grados), porcentaje de helicidad α , etc. se llevaron a cabo con el módulo *ptraj* de AMBER. Las estructuras tridimensionales y las trayectorias fueron visualizadas usando el programa PyMol³⁷.

4.9. Ensayos biológicos.

Los ensayos biológicos de los péptidos sintetizados se realizaron en el laboratorio del Prof. Antonio Jiménez (Universidad de Alcalá de Henares).

4.9.1. *Ensayo de inhibición de la actividad oxidorreductasa de la Li-TryR*

Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Hamilton y colaboradores³⁸, en el que se acopla el proceso de reducción del sustrato de la enzima (tripanotión oxidado, TS_2) a partir del cofactor NADPH, con la reducción del ácido ditironitrobenzoico (DTNB) para generar ácido tionitrobenzoico (TNB), que se detecta por espectroscopía de absorción, midiendo a 412 nm. Así, por cada molécula de NADPH que se reduce, se generan dos moléculas de ácido tionitrobenzoico (TNB).

El ensayo se lleva a cabo incubando la enzima (7 nM) en presencia de los péptidos disueltos en DMSO. Concentraciones finales: 75.00, 37.80, 18.75, 9.30, 4.68, 2.34, 1.17, 0.58 y 0.29 μ M en una placa multipocillo (volumen final de ensayo de 200

μL) durante 10 min en ausencia de NADPH y a 26°C, en las siguientes condiciones: HEPES 40 nM (pH 6.9-7.0), EDTA 1 mM, NADP⁺ 30 μM y DTNB 25 μM. La reacción comienza tras añadir 50 μL de una disolución de tripanotión oxidado (1 μM) y NADPH (150 μM). El curso de la reacción es seguido durante 60 min, registrando medidas de absorbancia cada minuto. Las medidas puntuales de inhibición de la actividad de la enzima se realizó a las concentraciones de 15 μM (péptidos grapados) y 11.8 μM (análogos lineales). La concentración final de DMSO y glicerol en el ensayo es de 1.75% y 0.025% en volumen, respectivamente. Los valores de la concentración IC₅₀, se determinaron a partir de las pendientes a tiempos iniciales (0 - 20 min), tras normalizar con respecto al control sin péptido (sólo DMSO), usando el programa GraFit 6³⁹ (Erithacus Software Limited).

4.9.2. *Ensayo de inhibición de la dimerización de la Li-TryR.*

Este ensayo ha sido implementado recientemente por el laboratorio del Prof. Antonio Jiménez (Universidad de Alcalá). Se basa en la detección ELISA en placa multipocillo (96 posiciones) del porcentaje de dímero en presencia de inhibidores de la dimerización. Cada uno de los monómeros de la enzima presenta un *tag* de T7, y además un *tag* FLAG o un *tag* HIS. Una vez co-expresados los monómeros co-expresados en la misma bacteria, se purifican usando una matriz de Ni-NTA y se inmovilizan en una placa de poliestireno tapizada con anticuerpo *anti*-FLAG M2 (SIGMA). Tras lavar, sólo quedarán anclados a la placa los heterodímeros HIS/FLAG, los cuales son detectados en el ensayo con un anticuerpo anti-HIS marcado con peroxidasa (HRP).

Preparación de la placa. En cada pocillo de placa se siembra anti-FLAG M2 (40-60 μg) disuelto en PBS (60 μL). Posteriormente se incuba 2 h en cámara húmeda a temperatura ambiente, se lava con TTBS (3 x 200 μL) y se bloquean las posiciones reactivas de la placa con BSA al 3% (200 μL) durante 12 h a 4°C.

Procedimiento: El volumen final de ensayo es 200 μL. El ensayo consta de dos controles: control de carga de proteína (*tag*-T7), y control de actividad (ausencia de péptido, sólo DMSO). A una placa tapizada con anticuerpo anti-FLAG, se añade el tampón de dimerización (200 μL, proteína 400 nM, Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM) y el péptido (disuelto en DMSO al 75% en agua; concentraciones finales: 93.75, 48.88, 22.44 y 11.72 μM). La placa se incuba durante 16 h a 37 °C con agitación orbital constante. Posteriormente se lava con TTBS (10 x 200 μL), se añade anticuerpo anti-HIS-HRP en TTBS con leche desnatada al 5% (200 μL, 1:5000) y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente. Se lava con TTBS (10 x 200 μL, 30 s), se añade el sustrato cromóforo OPD (100 μL) y se incuba a temperatura ambiente durante 10 min protegido de la luz. La reacción se para con H₂SO₄ (100 μL 0.5 M). La lectura se realiza en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 490 nm.

4.10. Bibliografía

1. Armstrong, S. K., Ring closing diene metathesis in organic synthesis. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 371-388.
2. Rush, J.; Bertozzi, C. R., An alpha-formylglycine building block for Fmoc-based solid-phase peptide synthesis. *Org. Lett.* **2006**, 8, 131-134.
3. Stymiest, J. L.; Mitchell, B. F.; Wong, S.; Vederas, J. C., Synthesis of Oxytocin Analogues with Replacement of Sulfur by Carbon Gives Potent Antagonists with Increased Stability. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7799-7809.
4. Roice, M.; Johannsen, I.; Meldal, M., High Capacity Poly(ethylene glycol) Based Amino Polymers for Peptide and Organic Synthesis. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, 23, 662-673.
5. Weerapana, E.; Speers, A. E.; Cravatt, B. F., Tandem orthogonal proteolysis-activity-based protein profiling (TOP-ABPP)[mdash]a general method for mapping sites of probe modification in proteomes. *Nat. Protocols* **2007**, 2, 1414-1425.
6. Williams, R. M.; Im, M. N., Asymmetric synthesis of monosubstituted and alpha,alpha-disubstituted alpha-amino acids via diastereoselective glycine enolate alkylations. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9276-9286.
7. Shi, B.; Hawryluk, N. A.; Snider, B. B., Formal Synthesis of (\pm)-Guanacastepene A. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 1030-1042.
8. Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L., An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5891-5892.
9. Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R., A practical guide for the assignment of the absolute configuration of alcohols, amines and carboxylic acids by NMR. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 2915-2925.
10. Kusumi, T.; Fukushima, T.; Ohtani, I.; Kakisawa, H., Elucidation of the absolute configurations of amino acids and amines by the modified mosher's method. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 2939-2942.

11. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
12. Christensen, T., A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil. *Acta Chem. Scand.* **1979**, *33*, 763-766.
13. Redfield, A. G.; Kunz, S. D.; Ralph, E. K., Dynamic range in Fourier transform proton magnetic resonance. *J. Magn. Reson.* **1975**, *19*, 114-117.
14. Wüthrich, K.; Billeter, M.; Braun, W., Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 715-740.
15. Goddard, T. D.; Kneller, D. G. SPARKY 3, University of California, San Francisco.
16. Cornilescu, G.; Delaglio, F.; Bax, A., Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 289-302.
17. Goddard, T. D.; Kneller, D. G. SPARKY 3, University of California, San Francisco.
18. Shen, Y.; Delaglio, F.; Cornilescu, G.; Bax, A., TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR* **2009**, *44*, 213-223.
19. Koradi, R.; Billeter, M.; Wuthrich, K., MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 51-55, 29-32.
20. Este programa se incluye ahora dentro del paquete de Schrödinger. URL: www.pymol.org.
21. Henchey, L. K.; Kushal, S.; Dubey, R.; Chapman, R. N.; Olenyuk, B. Z.; Arora, P. S., Inhibition of Hypoxia Inducible Factor 1—Transcription Coactivator Interaction by a Hydrogen Bond Surrogate α -Helix. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *132*, 941-943.
22. URL: <http://agadir.crg.es/>

23. URL: <http://ambermd.org/>
24. Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A., Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2603-2612.
25. URL: <http://www.rcsb.org/pdb>
26. Aqvist, J., Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8021-8024.
27. Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A., A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.
28. URL: www.gaussian.com
29. URL: www.pharmacy.manchester.ac.uk/bryce/amber/
30. Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham III, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Crowley, M.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wu, J. X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Kollman, P. A.; AMBER 10, U. o. C., San Francisco., *AMBER 10*. San Francisco, 2008.
31. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A., A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179-5197.
32. Tsui, V.; Case, D. A., Molecular Dynamics Simulations of Nucleic Acids with a Generalized Born Solvation Model. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2489-2498.
33. Jayaram, B.; Sprous, D.; Beveridge, D. L., Solvation Free Energy of Biomacromolecules: Parameters for a Modified Generalized Born Model Consistent with the AMBER Force Field. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9571-9576.

34. Harris, S. A.; Gavathiotis, E.; Searle, M. S.; Orozco, M.; Laughton, C. A., Cooperativity in Drug–DNA Recognition: A Molecular Dynamics Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12658-12663.
35. Zoete, V.; Irving, M. B.; Michielin, O., MM-GBSA binding free energy decomposition and T cell receptor engineering. *J. Mol. Recognit.* **2010**, *23*, 142-152.
36. Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T., Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127-6129.
37. URL: www.pymol.org
38. Hamilton, C. J.; Saravanamuthu, A.; Eggleston, I. M.; Fairlamb, A. H., Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem. J.* **2003**, *369*, 529-537.
39. URL: www.erithacus.com/grafit